

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie
der Freien Universität Berlin

Über die Isolierung von
Globin-Messenger-Ribonucleoproteid
und Ribonucleinsäure aus Hühner-
erythroblasten sowie deren Translation
im zellfreien System

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sylvia Schröter
aus Görlitz

1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Über die Isolierung von
Globin-Messenger-Ribonucleoproteid
und Ribonucleinsäure aus Hühner-
erythroblasten sowie deren Translation
im zellfreien System

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sylvia Schröter
aus Görlitz

Referent: Prof.Dr.Dr.H.Tiedemann

Korreferent: Prof.Dr.D.Reubert



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 29.4.1976

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof.
Dr.Dr.H.Tiedemann am Institut für Physiologische Chemie
der Freien Universität Berlin angefertigt.

Herrn Prof.Dr.Dr.H.Tiedemann bin ich für die Ueberlassung
des Themas und für die zur Verfügung gestellten Mittel
zu Dank verpflichtet.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr.W.Knöchel, der
mir mit seiner Erfahrung und seiner ständigen
Diskussionsbereitschaft stets hilfreich zur Seite stand.

Im Text gebrauchte Abkürzungen:

tRNA	transfer Ribonucleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
mRNP	messenger Ribonucleoproteid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
HnRNA	(Heterogeneous nuclear RNA) heterogene Kern-Ribonucleinsäure
S	Sedimentationskonstante in Svedbergeinheiten(S) (S) = 10^{-13} sec
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
RWF	Ribosomale Waschfraktion
PPO	2.5-Diphenyloxazol
Dimethyl POPOP	1.4-2(-4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol
EDTA	Aethylendiamintetraessigsäure
E	Extinktion
2-ME	2-Mercaptoäthanol
SDS	Natriumdodecylsulfat

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	5
2. <u>Ziel der Arbeit</u>	8
3. Methoden und Material	8
3.1 Isolierung von Globin mRNP und mRNA	8
3.1.1 Isolierung unreifer roter Blutzellen aus Hühnern	8
3.1.2 Präparation des postmitochondrialen Ueberstandes und der Polysomen	9
3.1.3 Abtrennung des mRNP aus EDTA dissoziierten Polysomen durch Saccharosegradienten- zentrifugation	10
3.1.4 Isolierung von mRNP und isopyknische CsCl-Gradientenzentrifugation	10
3.1.5 Isolierung von mRNA	12
3.2 Isolierung ribosomaler Waschfraktionen	12
3.3 Präparation eines zellfreien Systems aus Ehrlich Aszites Zellen	13
3.4 Zellfreie Proteinsynthese	14
3.5 Präparation von Globinketten aus Hühner- erythroblasten	15
3.6 Produktanalyse	15
3.6.1 Gelfiltration über Sephadex G 100	15
3.6.2 Carboxymethylcellulose-Chromatographie	16
3.7 Messung der Radioaktivität	17
3.7.1 Messung von TCA gefälltem Material	17
3.7.2 Messung in wässriger Lösung	17
3.8 Puffer	17
3.9 Chemikalien	18
4. <u>Ergebnisse</u>	19
4.1 Globin mRNA	19
4.2 Translation der mRNA im zellfreien System	20

4.2.1	Abhängigkeit der Translation von K^{+} -, Mg^{2+} -, und mRNA - Konzentrationen	23
4.2.2	Abhängigkeit der Proteinsynthese von der Inkubationszeit (∇ mRNA)	28
4.3	Translation der mRNA in Gegenwart von RWF	29
4.4	Produktanalyse der in Gegenwart von mRNA synthetisierten Proteine	32
4.5	Isolierung von mRNP	33
4.6	Analyse der mRNP Fraktion durch iso- pyknische $CsCl$ -Gradientenzentrifugation	36
4.7	Translation des mRNP im zellfreien System	38
4.7.1	Abhängigkeit der Translation von K^{+} -, Mg^{2+} - und mRNP - Konzentrationen	38
4.7.2	Abhängigkeit der Proteinsynthese von der Inkubationszeit (∇ mRNP)	44
4.8	Translation des mRNP in Gegenwart von RWF	44
4.9	Produktanalyse der in Gegenwart von mRNP synthetisierten Proteine	45
4.10	Vergleich von mRNA und mRNP	46
4.10.1	Vergleich der Absorptionsspektren	46
4.10.2	Vergleich der Ionenbedingungen	46
4.10.3	Vergleich der biologischen Aktivitäten	50
4.10.4	Vergleich der Produktanalysen	51
5.	<u>Diskussion</u>	52
6.	<u>Zusammenfassung</u>	56
7.	<u>Literaturverzeichnis</u>	58

1. Einleitung

Die 1961 von F.Jacob und J.Monod¹⁾ zunächst für Bakterien aufgestellte Theorie, daß eine spezielle RNA Art (messenger RNA) für den Informationstransfer von der DNA zum Protein zuständig ist, darf heute auch bei Eukarionten als erwiesen angesehen werden. Bei Zellen höherer Organismen verläuft die Biosynthese dieser RNA in mehreren Stufen. Im ersten Schritt der Transkription wird die DNA von einem bestimmten Enzym, der DNA abhängigen RNA Polymerase II A und B, in RNA übersetzt. (S.P.Blatti et al.²⁾ ; P.Chambon et al.³⁾ ; E.A.Zylber⁴⁾).

Dieses Enzym ist gegenüber anderen Polymerasen dadurch charakterisiert, daß es gegen bestimmte Substanzen z.B. α -Amanitin, sensitiv ist. Ähnlich wie bei der Transkription der ribosomalen und transfer RNA Gene entsteht auch in diesem Fall ein höhermolekulares mRNA-Vorläufermolekül. (K.Scherrer et al.⁵⁻⁷⁾ ; G.Georgiev et al. ^{8,9)} ; R.Soihero und J.E.Darnell¹⁰⁾).

Wegen ihrer äußerst unterschiedlichen Größenverteilung wird diese RNA Spezies heterogene Kern RNA (heterogeneous nuclear RNA = HnRNA) genannt. Nach neueren Untersuchungen enthalten sie zu einem großen Teil repetitive Sequenzen (G.R.Molloy et al.¹¹⁾). Die Protein codierende Sequenz befindet sich am 3' Ende des Moleküls. Beim Reifungsvorgang (Processing) erfolgt zunächst das Anhängen eines Poly A Segmentes (ca. 200 Adenylsäuren) an das 3' Ende, (J.Men-decki et al.¹²⁾ ; G.R.Molloy et al.¹³⁾) gefolgt von einem Abbau der repetitiven Sequenzen vom 5' Ende her. Das auf diese Weise gebildete RNA Molekül wird ins Cytoplasma ausgeschleusst. Die Vorläufer-Produkt-Beziehung zwischen HnRNA und mRNA wurde am Eindrucksvollsten durch die Entdeckung gewisser Protein codierender Sequenzen in der HnRNA nachgewiesen. Die mit der reversen Transkriptase in vitro synthetisierte DNA Kopie der Globin mRNA aus unreifen roten

Blutzellen konnte mit HnRNA aus den gleichen Zellen hybridisiert werden (T.Imaizumi et al.¹⁴).

HnRNA aus erythropoetischen Zellen verschiedener Organismen und aus Myeloma Zellen konnte in Globinketten (R.Williamson et al.¹⁵); A.Ruiz-Carillo et al.¹⁶) bzw. Immunglobulin (R.H.Stevens und A.R.Williamson¹⁷) translatiert werden.

Im Unterschied zu Prokaryonten findet man in den Zellen höherer Organismen außer tRNA keine freie RNA, sondern immer RNA Proteinkomplexe. Auch die HnRNA wird während der Transkription oder direkt danach an ganz bestimmte Proteine gebunden (G.P.Georgiev und O.P.Samarina¹⁸). Die Funktion dieser Proteine ist noch nicht endgültig geklärt. Interessant für den Vorgang des Processing ist, daß sie Ribonuclease- und Poly A Synthetaseaktivitäten enthalten sollen (J.Niesing und C.E.Sekeris^{19,20}).

Im Cytoplasma findet man eine nicht ribosomale heterodisperse RNA, die z.T. an Polysomen gebunden ist und somit nach ihrer Funktion eindeutig als messenger RNA charakterisiert ist. Auch hier ist die RNA an Protein gebunden. Die ersten Arbeiten über diese mRNP Komplexe in Zellen höherer Organismen erschienen noch bevor es gelang, einzelne RNA Spezies aus Eukaryonten zu isolieren und zum Beweis ihrer messengerfunktion zu translatieren. A.S.Spirin et al.²¹) beschrieben 1964 erstmalig die Existenz solcher RNA Proteinkomplexe und nannten sie Informosomen. Es wurde vermutet, daß mRNA in Form solcher Komplexe vom Zellkern ins Cytoplasma transportiert wird, wo die Proteinbiosynthese stattfindet.

Die Proteine in diesen Komplexen wurden in letzter Zeit näher untersucht. In vergleichenden Untersuchungen von an Polysomen gebundenen mRNP Komplexen aus verschiedenen Organismen wurde die Existenz von zwei Proteinen beschrieben (M = ca. 50 000 und ca. 78 000), die für verschiedene Organismen in ihrem elektrophoretischen Verhalten weitgehend identisch sind (R.N.Bryan und M.Hayashi²²).

Ferner wurde gefunden, daß die Kern HnRNA und cytoplasmatische

mRNA gebundenen Proteine auch in gleichen Organismen und Geweben verschieden sind (C.Morel et al.²³); E.M.Lukanidin et al.²⁴). Ihre Funktion konnte jedoch noch nicht geklärt werden.

Zur Zeit werden unter anderem folgende zwei Möglichkeiten diskutiert. Einmal können diese Proteine beim Transport der mRNA vom Kern ins Cytoplasma beteiligt sein. Da im Kern jedoch andere Proteine an die mRNA gebunden sind als im Cytoplasma, muß an der Kernmembran ein Austausch der Proteine erfolgen, was die Transporttheorie nicht sehr wahrscheinlich macht. Wichtig in diesem Zusammenhang scheint das Anknüpfen des Poly A Segmentes an die HnRNA zu sein. Es konnte gezeigt werden, daß in Gegenwart von Cordycepin (3'-Desoxyadenosin) die HnRNA weiter synthetisiert wird, jedoch infolge Ausbleibens der Anknüpfung des Poly A Segmentes keine mRNA mehr in das Cytoplasma gelangt (S.Penman et al.²⁵).

Die zweite Möglichkeit besteht in einer Beteiligung des Proteins des mRNP Komplexes an der Translationskontrolle. Schon seit längerer Zeit ist bekannt, daß Proteine an der Kontrolle der Transkription beteiligt sind. Beispiele hierfür sind das von F.Jacob und J.Monod¹) postulierte und kürzlich in seiner Sequenz aufgeklärte Lac Operon Repressor Molekül (K.Beyreuther et al.²⁶) und die von J.Paul und R.S.Gilmour²⁷) untersuchten sauren Nicht-Histon-Proteine, die bei der gewebsspezifischen Transkription beteiligt sein sollen. Sollten gewebsspezifische oder sogar messenger spezifische Proteinfaktoren auch an der Kontrolle der Translation beteiligt sein, dürfte a priori eine unterschiedliche Effizienz bei der Translation von mRNA gegenüber dem mRNP Komplex zu erwarten sein.

2. Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, Globin-messenger-Ribonucleoproteid und Messenger-Ribonucleinsäure aus Hühnererythroblasten, deren Proteinsynthese zu 90% aus Globin besteht, zu isolieren und deren Translation in einem vorinkubierten zellfreien System aus Ehrlich-Aszites Tumorzellen zu untersuchen. Es sollten optimale Bedingungen in Hinsicht auf Konzentrationen, Abhängigkeit von Stimulationsfaktoren, Ionenstärken und Inkubationszeiten herausgefunden und einander gegenübergestellt werden. Durch diesen direkten Vergleich von messenger-Ribonucleoproteid und Messenger-Ribonucleinsäure sollte untersucht werden, ob die Proteine des RNP-Komplexes die Translation der mRNA beeinflussen.

3. Methoden und Material

3.1 Isolierung von Globin mRNP und mRNA

3.1.1 Isolierung unreifer roter Blutzellen aus Hühnern

Als Ausgangsmaterial dienten ein bis eineinhalb Jahre alte ca. 1 - 1.5 kg schwere weiße Leghornhennen. Die Tiere wurden anämisch gemacht, indem ihnen an vier aufeinanderfolgenden Tagen eine Phenylhydrazinlösung (2.5%; 10 mg/kg; pH 7.5) subkutan injiziert wurde. (H.Schall und F.Turba²⁸)

Zur Blutgewinnung wurden die Tiere am sechsten Tag narkotisiert und anschließend die Vena Jugularis vorsichtig freipräpariert. Um eine Blutgerinnung zu vermeiden, wurde jeweils 1 ml einer Heparinlösung (10mg/ml) injiziert. Nach Abwarten der Kreislaufzeit wurde die Vene durchtrennt

und das Blut in einem vorher gekühlten Erlenmeyerkolben aufgefangen. In ihm befand sich 1/10 Vol. 5%iger Na-Citratlösung, bezogen auf ein zu erwartendes Durchschnittsvolumen von 70 ml Blut.

Die folgenden Arbeiten wurden im Eisbad bzw. bei Temperaturen unter 4°C durchgeführt. Die Blutzellen wurden 10 Minuten bei 1500x g abzentrifugiert. Das Plasma, sowie die weißen Blutzellen, die sich als feine Schicht über den roten Blutzellen befanden, wurden mit einer Pasteurpipette durch Wasserstrahlvakuum abgesogen. Die roten Zellen wurden im dreifachen Volumen Puffer 1 aufgenommen, gut durchmischt, wiederum bei 1500x g abzentrifugiert und der Ueberstand abgesogen. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt.

3.1.2 Präparation des postmitochondrialen Ueberstandes und der Polysomen

Die Zellen wurden im dreifachen Volumen von Puffer 2 aufgenommen und fünf Minuten unter leichtem Rühren ly-siert. Danach wurde 1/10 Volumen (bezogen auf Puffer 2) Puffer 3 hinzugegeben.

Zur quantitativen Zerstörung der Zellen wurde die Lösung mittels eines locker eingepaßten Dounce Homogenisators mit 3 - 5 Strokes nachhomogenisiert. Das Homogenat wurde bei 11 000 x g und 0°C im Spinco R 30 Rotor für 15 Minuten zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Zellen, Kerne und Mitochondrien zu entfernen. Die Sedimente wurden verworfen.

Zur Polysomengewinnung wurde der postmitochondriale Ueberstand im Spinco Ti 60 Rotor für 90 Minuten bei 50 000 Umdrehungen/Minute und 0°C zentrifugiert. Eine Unterschichtung des postmitochondrialen Ueberstandes mit 3 ml 0.8 M Saccharose in Puffer 4 bewirkte, daß die

sedimentierten Polysomen weitgehend frei von Verunreinigungen waren. Die abzentrifugierten Polysomen wurden weiter verarbeitet, der Ueberstand wurde verworfen.

3.1.3 Abtrennung des mRNP aus EDTA dissoziierten Polysomen durch Saccharosegradientenzentrifugation

Die Polysomen wurden in Puffer 5 aufgenommen und in einem locker eingepaßten Dounce Homogenisator mit 3 - 6 Strokes homogenisiert. Die Lösung wurde 0.03 M an EDTA gemacht, welches als Komplexbildner zweiwertige Ionen wie z.B. Mg^{2+} bindet. Dabei zerfallen die Polysomen vollständig in mRNP Komplex sowie in kleine und große ribosomale Untereinheiten.

Das so dissoziierte Material wurde durch Zentrifugation im Spinco Zonal Rotor Ti 14 über einen 7 - 32% Saccharosegradienten (Gewicht/Volumen) in Puffer 6 für 24 Stunden bei 32 000 Umdrehungen/Minute und 0°C aufgetrennt. Die Fraktionierung erfolgte in einem LKB 7 000 Ultro Rac Fraktionssammler. Die Extinktion wurde bei 254 nm kontinuierlich mit einem LKB Uvicord II Photometer (Lichtweg der Durchflußzelle: 0.3 cm) gemessen, an das ein Beckman 10" Schreiber angeschlossen war.

3.1.4 Isolierung von mRNP und isopyknische CsCl-Gradientenzentrifugation

Das Material, welches das mRNP enthielt, sedimentierte zwischen 15 S und 20 S. Für die Isolierung des Globin mRNP wurde nur die Fraktion verwendet, die dem Peak der Extinktionskurve entsprach. Das mRNP wurde in einem Visking Schlauch 5 Stunden gegen 1 Liter Puffer 6 dialysiert,

wobei der Puffer stündlich gewechselt wurde. Das so erhaltene mRNP wurde direkt für den biologischen Test verwendet.

Ein Teil des mRNP wurde mittels einer isopyknischen Zentrifugation in CsCl weiter untersucht. Dazu wurden mehrere Milliliter des Materials gegen Puffer 7 umdialysiert, der statt TRIS Triäthanolamin enthielt. Dies war notwendig, weil TRIS aufgrund seiner freien NH_2 -Gruppe mit dem zur Fixierung notwendigen Formaldehyd reagiert, während Triäthanolamin sich indifferent verhält (M.G. Hamilton²⁹).

Nach der Dialyse wurde das Material mit einer 36%igen Formaldehydlösung (pH 7.5) bis zu einer Endkonzentration von 6% versetzt. Die Fixierung von mRNP Komplex mit Formaldehyd bewirkt eine Vernetzung der RNA mit Proteinen über Methylenbrücken. Sie ist notwendig, da sonst bei hohen CsCl Konzentrationen RNA und über Wasserstoffbrücken gebundenes Protein dissoziieren (A.S. Spirin et al.³⁰). Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 2°C wurde das Material weitere 24 Stunden in einem Visking Schlauch gegen Puffer 8 dialysiert. Der Dialysepuffer wurde zweimal gewechselt. Nach Zugabe von CsCl bis zu einer Endkonzentration von 42% (Gewicht/Gewicht) wurde die Lösung in einem Spinco SW 65 Rotor 48 Stunden bei 25°C und 48 000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Der Gradient wurde mittels eines 'recovery system' (Beckman) und einer peristaltischen Pumpe mit einer konstanten Geschwindigkeit eluiert.

Zur Berechnung der Schwebedichten wurden im Abbé-Refraktometer (Zeiss) bei 25°C die Brechungsindices der einzelnen Fraktionen gemessen. Aus den Brechungsindices n_D lassen sich nach C.L. Schildkraut et al.³¹ die Dichten ρ über folgende Formel bestimmen:

$$\rho_{25^\circ\text{C}} = 10,8601 \cdot n_{D, 25^\circ\text{C}} - 13,4974$$

Eine Tabellierung der Brechungsindex-Dichte-Beziehung für CsCl Lösungen findet sich in der Literatur (H.A. Sober und R.A.Harte³²⁾). Die neben dem CsCl in der Lösung befindlichen Fremdsalze erforderten eine Korrektur, die bei der Bestimmung der Schwebedichten berücksichtigt wurde.

3.1.5 Isolierung von mRNA

Globin mRNA wurde in Anlehnung an G.Huez et al.³³⁾ gewonnen. Die Fraktionen des Zonallaufes, die das mRNP enthielten, wurden gepoolt. Nach Zugabe von 1% SDS und 1.5% NaCl wurde das Material mit zwei Volumen 96%igem Aethanol gefällt. Die RNA wurde in einem Spinco SW 27 Rotor für 45 Stunden bei 27 000 Umdrehungen/Minute durch einen 12 - 30% (Gewicht/Volumen) Saccharosegradienten in Puffer 2 zentrifugiert. Die Fraktionen, die die bei 9 S sedimentierte mRNA enthielten, wurden vereinigt. Anschließend folgte eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Extraktion, um restliche an der RNA gebundene Proteine zu entfernen (H.Aviv und P.Leder³⁴⁾). Die RNA wurde durch Zugabe von zwei Volumen 96%igem Aethanol gefällt und zweimal mit 66%igem Aethanol gewaschen. Das Präzipitat wurde in wenigen Millilitern aqua dest. gelöst und 12 Stunden gegen aqua dest. dialysiert. Nach Lyophilisieren wurde die mRNA in aqua dest. in einer Endkonzentration von 1mg/ml gelöst und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2 Isolierung ribosomaler Waschfraktionen

Ribosomale Waschfraktionen aus Polysomen von Hühnererythroblasten wurden in Anlehnung an S.M.Heywood³⁵⁾ gewonnen. Ca. 100 mg Polysomen wurden in 2 ml Puffer 11 suspendiert und in einem locker eingepaßten Dounce

Homogenisator mit 10 Strokes homogenisiert. Das Homogenat wurde eine Stunde bei 0°C unter Vermeidung von Schaumbildung gerührt und anschließend im Spinco Ti 50 Rotor bei 0°C und 48 000 Umdrehungen/Minute für zwei Stunden zentrifugiert. Der Ueberstand wurde bei 4°C auf eine mit Puffer 12 äquilibrierte Sephadex G 25 Säule (18 x 2 cm) aufgetragen. Fraktionen zu 8 Tropfen wurden aufgefangen und nach Entnahme eines Aliquotes für die Messung der Extinktion in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.3 Präparation eines zellfreien Systems aus Ehrlich Aszites Zellen

Zur Translation von Globin mRNP und mRNA aus Hühnererythroblasten wurde ein zellfreies System aus Ehrlich Aszites Zellen gewählt, das in Anlehnung an M.B. Mathews und A. Korner³⁶⁾ gewonnen wurde. Die Tumorzellen wurden nach intraperitonealer Transplantation in Mäusen gezüchtet. 0.2 - 0.4 ml der Aszitesflüssigkeit wurden steril von Spender- auf Empfänger-mäuse übertragen. Neun bis zehn Tage später wurden die Mäuse durch cervikale Dislokation getötet, das Peritoneum wurde freipräpariert und so eingeschnitten, daß kein Blutgefäß getroffen wurde. Die auslaufende Aszitesflüssigkeit wurde in einem mit Gaze abgedeckten Becher aufgefangen, der zu einem Drittel mit kaltem Puffer 13 gefüllt war. Pro Maus konnten ca. 10 ml Aszites mit ca. 10^8 Zellen/ml (entsprechend 2 - 3g gewaschenen Zellen) gewonnen werden.

Die Zellen wurden fünf Minuten bei 1500 x g abzentrifugiert und der Ueberstand, sowie die roten Blutzellen, mit einer Pasteurpipette durch Wasserstrahlvakuum abgesogen. Nach mehrmaligem Waschen in Puffer 13 wurden die Asziteszellen in zwei Volumen Puffer 14 für 10 Minuten im Eisbad bei gelegentlichem Rühren lysiert. Zur vollständigen Zerstörung der Zellen wurde die Lösung mittels eines fest eingepaßten Dounce Homogenisators mit 30 Strokes nachhomogenisiert. Nach Zugabe von 1/10 Volumen Puffer 15 (bezogen

auf das Volumen an Puffer 14) wurde das Homogenat im Spinco A1 30 Rotor bei 13 000 Umdrehungen/Minute und 2°C zentrifugiert.

Der postmitochondriale Ueberstand wurde ohne Lipidschicht in einen Erlenmeyerkolben überführt und nach Zugabe von 1/20 Vol. EGS (20mmol ATP, 2mm GTP, 0.1M Kreatinphosphat, 0.2 mg Kreatinkinase/ml)

1/100 Vol. 18 AS 5mm

1/100 Vol. Leucin 5mm

1/100 Vol. Cystein 5 mm

30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Der Ansatz wurde in einer Kühlsole auf 0°C abgekühlt und während der Inkubation sich bildende Präzipitate im Spinco A1 30 Rotor 15 Minuten bei 13 000 Umdrehungen/Minute und 0°C abzentrifugiert.

Der Ueberstand wurde in Portionen zu 5 ml über mit Puffer 16 equilibrierte Sephadex Säulen (18 x 2 cm) chromatographiert. Fraktionen zu 5 ml wurden gesammelt und nach Entnahme eines Aliquotes für die messung der Extinktion in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.4 Zellfreie Proteinsynthese

Die zellfreie Proteinsynthese wurde in Ansätzen zu 50 µl durchgeführt. Jeder Ansatz enthielt folgende Bestandteile:

0.4 E₂₆₀ Einheiten des 30 Minuten vorinkubierten Aszites Extraktes,

20 mM TRIS (pH 7.5)

50 µM von jeder der 19 Aminosäuren außer der radioaktiven,

0.5 µCi [³H] Leucin (38 Ci/mM)

1 mM ATP

0.1 mM GTP

5 mM Kreatinphosphat

10 µg Kreatinphosphokinase

7 mM Mercaptoäthanol

Bei einigen Experimenten wurden ribosomale Waschfraktionen in einer Konzentration von 0.06 E₂₈₀ Einheiten pro Ansatz hinzugegeben.

Die Zeit der Inkubation sowie Konzentrationen von mRNA bzw. mRNP, K⁺ und Mg²⁺ Ionen wurden in den einzelnen Ansätzen variiert. Der Einbau der Aminosäuren wurde durch Zugabe von 0.2 ml 0.1M KOH, die 1CmM kaltes Leucin enthielt, gestoppt. Nach weiterer Inkubation von 20 Minuten bei 37°C zur Hydrolyse von Aminoacyl-Transfer-RNA wurde die Rate der Proteinsynthese mittels Radioaktivität des durch Trichloressigsäure fällbaren Materials gemessen. (s. 3.7.1)

3.5 Präparation von Globinketten aus Hühnererythroblasten

Unmarkierte Globinketten wurden in Anlehnung an das von R.E.Lockard und J.B.Lingrel³⁷⁾ beschriebene Verfahren dargestellt. Zu 100 ml einer Mischung aus 3.5 g Oxalsäure in 100 ml Aceton (0.035 m an HCl) wurden bei -15°C 2.5 ml des 100 000 x g Polysomenüberstandes langsam zugetropft. Das feinflockige Präzipitat wurde bei 2000 x g abzentrifugiert und noch zweimal bei -10°C in Aceton gewaschen. Nach sorgfältigem Trocknen mittels Ölpumpenvakuum wurde das Material bei -20°C aufbewahrt. Die Ausbeute betrug ca. 25 mg Protein pro Milliliter Polysomenüberstand.

3.6 Produktanalyse

3.6.1 Gelfiltration über Sephadex G 100

Zur Produktanalyse wurde ein zehnfacher Ansatz bei optimalen Ionenkonzentrationen 60 Minuten bei 37°C inkubiert und der Einbau durch Zugabe von 0.1 ml 0.3 M EDTA-Lösung

gestoopt. 50 μ l des Inkubationsansatzes wurden zur Bestimmung der eingebauten Radioaktivität, wie unter 3.4 beschrieben, mit KOH versetzt und weiterbehandelt. Dem restlichen Material wurden 15 mg nicht radioaktive Globinketten (entsprechend 7.5 E₂₈₀ Einheiten) aus Hühnererythroblasten als Vergleichssubstanz hinzugefügt. Die Lösung wurde dann 24 Stunden gegen 1 Liter 7 molaren Harnstoff (pH 2.5 mit 10 n HCl eingestellt) - bei zweimaligem Pufferwechsel dialysiert und danach auf einer mit 7 M Harnstoff (pH 2.5) equilibrierten Sephadex G 100 Säule (1.6 x 100 cm) chromatographiert. Die Extinktion des Eluates wurde bei 280 nm gemessen. Fraktionen zu 2.5 ml wurden mittels eines LKB Ultorac Fraktionssammlers gesammelt. Aliquote von 0.1 ml wurden zur Bestimmung der Radioaktivität, wie unter 3.7.2 beschrieben, entnommen.

3.6.2 Carboxymethylcellulose-Chromatographie

Die Fraktionen der Sephadex G 100 Säule, die Globinketten enthielten, wurden gepoolt und gegen 2 l Puffer 17, bei zweimaligem Pufferwechsel, 24 Stunden dialysiert. Zur Auftrennung der Ketten wurde das Material über Carboxymethylcellulose-(CM 52, Whatman) Säulen (0.6 x 15 cm) chromatographiert. Es wurde ein linearer Gradient von 100 ml verwendet. Der Startpuffer enthielt 6 M Harnstoff, 0.127M Ameisensäure pH 3.54 (eingestellt mit Triäthylamin), der Endpuffer 6 M Harnstoff, 0.508 M Ameisensäure, pH 5.14 (eingestellt mit Triäthylamin).

Die Extinktion des Eluates wurde bei 280 nm gemessen und ein Aliquot von 0.4 ml zur Radioaktivitätsmessung entnommen. (s. 3.7.2)

3.7 Messung der Radioaktivität

3.7.1 Messung von TCA gefälltem Material

Zu jedem Ansatz wurden 0.3 ml einer γ -Globulinlösung (1 mg/ml, 0.7% NaCl als Träger) hinzugefügt. Die Proben wurden gut durchmischt. Nach Zugabe von 0.2 ml 30%iger Trichloressigsäure und erneutem Mischen wurden die Ansätze 10 Minuten ins Eisbad gestellt. Während dieser Zeit fiel sämtliches, durch Trichloressigsäure fällbares hochmolekulares Material aus. Anschließend wurde es bei 2000 $\times$ g abzentrifugiert und zweimal mit jeweils 1 ml 5%iger Trichloressigsäure gewaschen. Der Ueberstand wurde jedes Mal mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesogen. Die Sedimente wurden in 0.5 ml Hyamin (1M in Methanol) aufgenommen und zur vollständigen Auflösung 10 Minuten in einem Wasserbad bei 57°C erwärmt. Nach Aufnahme in 10 ml einer Lösung von 4 g Omnifluor/Liter Toluol wurden die Aktivitäten der Proben in einem Beckman LS 150 Szintillationszähler bestimmt.

3.7.2 Messung in wässriger Lösung

Die zur Radioaktivitätsbestimmung entnommenen Aliquote der Säuleneluate wurden in 15 ml eines Cocktails folgender Zusammensetzung gemessen: 7.5 g PPO, 0.15 g Dimethyl-POPOP in 670 ml Toluol, 330 ml Aethylenglykolmonomethyläther und 35 ml Hyamin. Die Aktivität der Proben wurde anschließend im Szintillationszähler bestimmt.

3.8 Puffer

Puffer 1 0.14 m NaCl, 0.004 m $MgCl_2$, 0.005 m KCl, 0.01 m TRIS, pH 7.4

- Puffer 2 0.004 m MgCl_2 , 0.01 m TRIS, 0.02 m KCl, pH 7.5
Der Puffer wurde vor Gebrauch 6 mM an 2-ME gemacht.
- Puffer 3 10 mM MgCl_2 , 100 mM TRIS, 800 mM KCl, pH 7.5
Der Puffer wurde vor Gebrauch 60 mM an 2-ME gemacht.
- Puffer 4 5 mM MgCl_2 , 20 mM TRIS, 100 mM KCl, pH 7.5
Der Puffer wurde vor Gebrauch 60 mM an 2-ME gemacht.
- Puffer 5 10 mM TRIS, 80 mM NaCl, 0.1 m EDTA, pH 7.5
- Puffer 6 10 mM TRIS, 36 mM KCl, 1.7 mM MgCl_2 , pH 7.5
- Puffer 7 10 mM Triäthanolamin, 36 mM KCl, 1.7 mM MgCl_2
pH 7.5
- Puffer 8 10 mM Triäthanolamin, 36 mM KCl, 1.7 mM MgCl_2 ,
1% Formaldehyd, pH 7.5
- Puffer 9 10 mM TRIS, 10 mM EDTA, pH 7.5
- Puffer 10 100 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 10 mM TRIS, pH 7.5
- Puffer 11 0.5 m KCl, 10 mM TRIS, pH 7.5
- Puffer 12 100 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 10 mM TRIS, pH 7.5
- Puffer 13 10 mM TRIS, 146 mM NaCl, pH 7.8
- Puffer 14 10 mM TRIS, 1.5 mM MgCl_2 , 15 mM KCl, pH 7.5
- Puffer 15 200 mM TRIS, 40 mM MgCl_2 , 800 mM KCl, pH 7.5
- Puffer 16 4 mM MgCl_2 , 80 mM KCl, 20 mM TRIS, pH 7.5
Der Puffer wurde vor Gebrauch 7 mM an 2-ME gemacht.
- Puffer 17 6 m Harnstoff, 0.127 m Ameisensäure, pH 3.54

3.9 Chemikalien

Chemikalien folgender Firmen wurden verwendet:

$[^3\text{H}]$ Leucin (38 Ci/mmol), The Radiochemical Center,
Amersham/England

Hyamin (1 m in Methanol), Fa. Packard Instrument International S.A., Zürich/Schweiz

Omnifluor, Fa. New England Nuclear, Dreieichenhain/Frankfurt am Main

Dimethyl-POPOP (1.4 bis 2(-4-Methyl-5-phenyloxazolyl)-Benzol, Werner Zinsser, Frankfurt

Saccharose (frei von Ribonuclease), Fa. Serva, Heidelberg
PPO (2.5-Diphenyloxazol); Aethylenglykolmonomethyläther, p.A.; EDTA (Aethylendiamintetraessigsäure) p.A.; Triäthanolamin p.A.; Formaldehyd (36%) p.A.; Trichloressigsäure p.A.; Fa. Merck, Darmstadt

Alle übrigen Substanzen wiesen den Reinheitsgrad p.A. auf. Lösungen von Formaldehyd und EDTA wurden vor Gebrauch mit KOH auf pH 7.5 eingestellt.

Mäuse mit Ehrlich Aszites Tumorzellen wurden freundlicherweise von Prof. Liss, Institut für klinische Chemie, Klinikum Steglitz Berlin, zur Verfügung gestellt.

4. Ergebnisse

4.1 Globin mRNA

Globin mRNA wurde aus unreifen roten Blutzellen anämischer Hühner gewonnen. Ein grundsätzliches Problem bei der Isolierung von mRNA besteht in der hohen Empfindlichkeit von mRNA gegenüber der Einwirkung von Ribonuclease. Es wurde jedoch auf einen Zusatz der üblichen RNAase Inhibitoren (Polyanionen wie Polyvinylsulfat, Diäthylpyrocarbonat, Bentonit u.a.) verzichtet, da eine Kontamination der RNA Präparation mit diesen Substanzen wahrscheinlich zu Störungen des biologischen Tests geführt hätte. Weil darüber hinaus der Gehalt der Erythroblasten an RNAase sehr gering ist (M.B. Mathews³⁸) wurde die Aufarbeitung lediglich bei Temperaturen um 0°C in möglichst kurzer Zeit durchgeführt.

Die durch 10 000 x g Zentrifugation des postmitochondrialen Ueberstandes gewonnenen Polysomen wurden durch Mg^{2+} Entzug dissoziiert. Der freigesetzte mRNP-Komplex, sowie die ribosomalen Untereinheiten konnten durch eine Zonalgradientenzentrifugation getrennt werden. (Abb. 1)

Die Fraktionen, die den mRNP-Komplex enthielten, wurden gepoolt und zwecks weitgehender Abdissoziation der Proteine mit 1% SDS versetzt. Nach der Fällung mit 96%igem Aethanol und zweimaligem Waschen mit 66%igem Aethanol wurde das Material auf einem weiteren Saccharosegradienten aufgetrennt. (Abb. 2)

Das Profil der Extinktion zeigt neben 18 S RNA aus der kleinen ribosomalen Untereinheit und bei ca. 4 - 5 S sedimentierendem Material (5 S RNA, tRNA, Proteine) einen Hauptpeak bei 9 S.

Die Fraktionen dieses Peaks wurden zur weiteren Reinigung von Proteinen einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Extraktion unterzogen. Die in der wässrigen Phase bleibende RNA wurde durch 96%iges Aethanol gefällt und nach zweimaligem Waschen mit 66%igem Aethanol gegen destilliertes Wasser dialysiert. Dieser Schritt war notwendig, um Spuren von SDS zu entfernen, durch die der biologische Test empfindlich gestört wird. Nach Lyophilisieren wurde die RNA in destilliertem Wasser aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

4.2 Translation der mRNA im zellfreien System

Zur Translation von mRNA aus Hühnererythroblasten wurde ein zellfreies System aus Ehrlich Aszites Zellen, welches von M.B. Mathews und A. Korner³⁶⁾ entwickelt wurde, gewählt. Dieses System aus Tumorzellen wurde bereits in Experimenten zur Translation verschiedener eukariotischer mRNA Spezies (Histon mRNA (M. Jacobs-Lorena et al.³⁹⁾; Kalbslinsen mRNA (H. Bloemendal⁴⁰⁾); Maus- und Kaninchen Globin mRNA (M.B. Mathews et al.^{36,41)}) mit Erfolg verwendet.

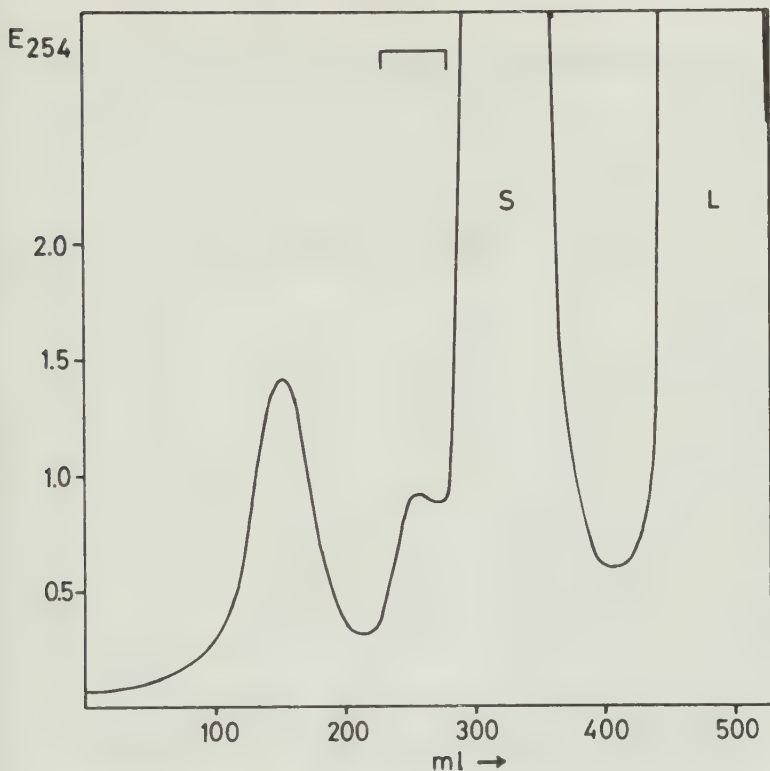


Abb. 1: Zonalgradientenzentrifugation :

Ca. 300 mg Polysomen aus unreifen roten Blutzellen anämischer Hühner wurden in 10 ml Puffer 5 aufgenommen, homogenisiert und mit 1 ml 0.3 M EDTA-Lösung (pH 7.45) versetzt. Die Auftrennung des Materials in mRNP-Komplex, große sowie kleine ribosomale Untereinheit erfolgte durch Zentrifugation im Spinco Zonal Rotor Ti 14 über einen 7 - 32% (Gewicht/Volumen) Saccharosegradienten in Puffer 6 für 24 Stunden bei 32 000 Umdrehungen/Minute und 0°C.

— (E_{254}) Extinktion bei 254 nm

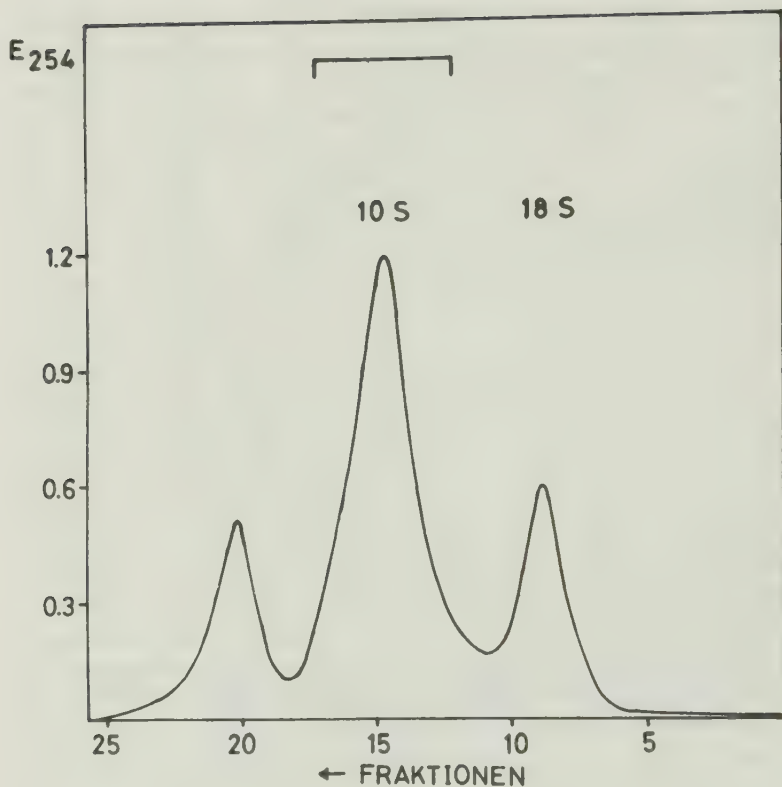


Abb. 2 : Isolierung von Globin mRNA durch Saccharose-
gradientenzentrifugation

Die durch Klammer gekennzeichneten Fraktionen der Zonalgradientenzentrifugation (ca. 50 ml) wurden gepoolt. Das Material wurde nach Zugabe von 1% SDS und 1.5% NaCl mit 2 Vol. 96%igem Aethanol gefällt und zweimal mit 66%igem Aethanol gewaschen. Es wurden je 0.3 mg RNA einem 12 - 30% (Gewicht/Volumen) Saccharosegradienten in Puffer 9 überschichtet. (Zentrifugiert wurde im Spinco SW 27 Rotor bei 27 000 Umdrehungen/Minute und 0°C).

— (E₂₅₄) Extinktion bei 254 nm

Bei diesem System läßt sich eine Vorinkubation durchführen, die durch Abbau der endogenen mRNA eine Herabsetzung der endogenen Proteinsynthese zur Folge hat, bei anschließender Zugabe von exogener mRNA jedoch zu einer beträchtlichen Stimulation der Proteinsynthese führt. Hierbei muß aber eingeräumt werden, daß die Vorinkubation eine Verminderung der gesamten Proteinsynthesekapazität bewirkt, was jedoch für die beabsichtigten Experimente von untergeordneter Bedeutung ist.

Ferner erleichtert die Wahl eines heterologen Systems die Analyse der durch Zugabe exogener RNA synthetisierten Proteine. So werden in Aszites Zellen keine Globinketten synthetisiert, wodurch sich die unter Zugabe exogener Globin mRNA synthetisierten Globinketten von den endogenen Proteinen unterscheiden lassen. Die Synthese von Globin ließ sich durch den Einbau von [^3H] markiertem Leucin verfolgen. Sowohl die endogene Proteinsynthese als auch die bei Zugabe von mRNA bzw. mRNP beobachtete Stimulation variierte bei verschiedenen Präparationen des zellfreien Systems und war besonders von der Dauer der Vorinkubation abhängig.

In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde einheitlich eine Vorinkubation von 30 Minuten gewählt.

4.2.1 Abhängigkeit der Translation von K^+ , Mg^{2+} und mRNA Konzentrationen

Die Stimulation durch Globin mRNA im zellfreien System aus Aszites Zellen war von der K^+ -, Mg^{2+} - und Messenger Konzentration abhängig.

Das K^+ Optimum wurde bei 2.1 mM Mg^{2+} und 0.5 μg mRNA/50 μl Ansatz bestimmt, wobei die K^+ Konzentration von 33.2 - 113.2 mM variiert wurde. Die Zeit der Inkubation betrug 60 Minuten. (Siehe Abb.3)

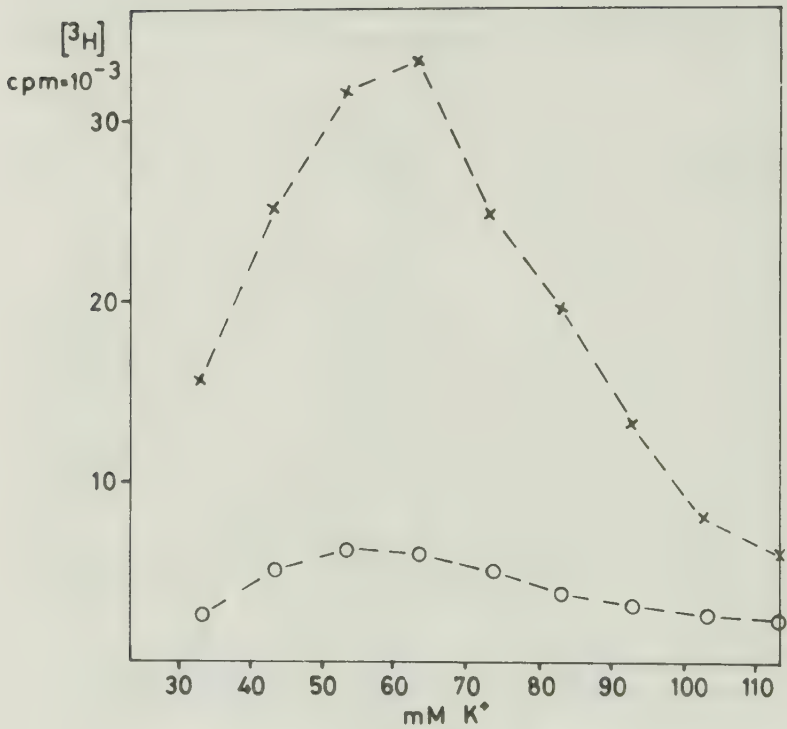


Abb. 3 K⁺ Kurve in Gegenwart ---+---+--- und Abwesenheit
--o--o-- von Globin mRNA
Mg²⁺: 2.1 mM; mRNA: 0.5 μ g/50 μ l Ansatz;
Inkubationsdauer: 60 Minuten

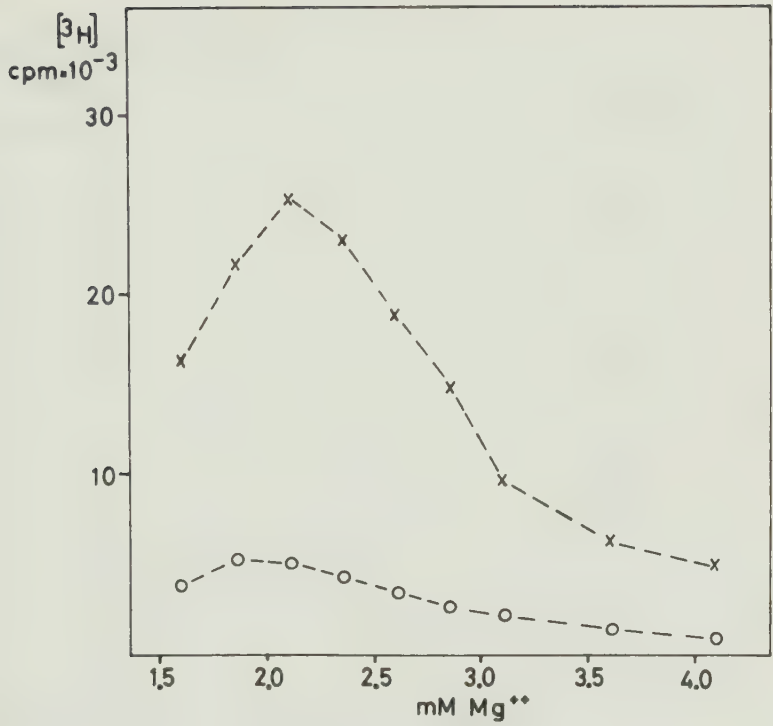


Abb. 4 Mg^{2+} Kurve in Gegenwart ----x---- und Abwesenheit --o--o-- von Globin mRNA.
 K^+ : 65 mM; mRNA: 0.5 μ g/50 μ l Ansatz;
Inkubationsdauer: 60 Minuten.

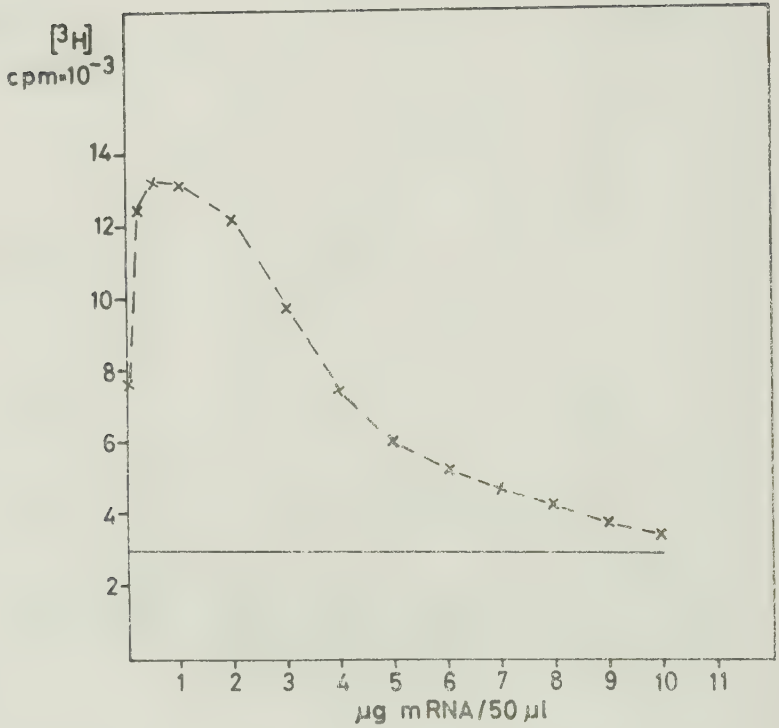


Abb. 5 Globin mRNA Konzentrationskurve

Mg^{2+} : 2.1 mM; K^{+} : 65 mM; Inkubationsdauer:
60 Minuten.

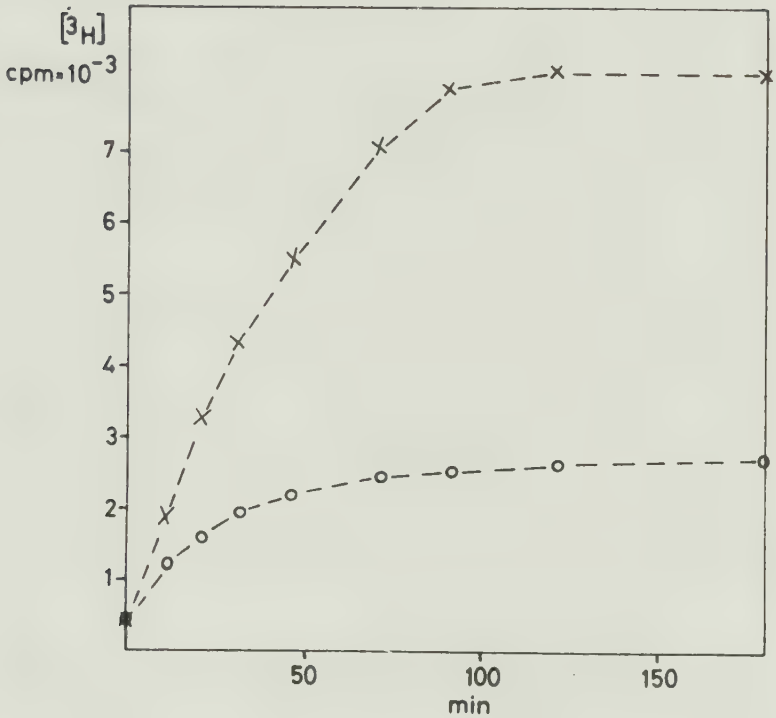


Abb. 6

Abhängigkeit der Proteinsynthese von der Inkubationszeit in Gegenwart ----x---- und Abwesenheit --o--o-- von Globin mRNA.

Mg²⁺: 2.1 mM; K⁺: 65 mM; mRNA: 50 μ g/50 μ l Ansatz

Wie Abb. 3 zeigt, ergibt sich für die Translation von 9 S Globin mRNA ein K^+ -Optimum bei einer Konzentration von etwa 65 mM, während der endogene Einbau bei einem etwas niedrigerem Wert liegt.

Zur Bestimmung des Mg^{2+} -Optimums wurde eine K^+ Konzentration von 65 mM eingehalten; die Konzentration an mRNA betrug 0.5 μ g/50 μ l Ansatz; inkubiert wurde 60 Minuten. Die Mg^{2+} Konzentration wurde von 1.6 - 4.1 mM variiert. (Abb. 4) Wie aus Abb.4 ersichtlich, ergibt sich für den Einbau ein relativ scharfes Maximum bei einer Mg^{2+} Konzentration von 2.1 mM.

Unterschiedliche Konzentrationen von Globin mRNA/50 μ l Ansatz wurden bei 65 mM K^+ , bei 2.1 mM Mg^{2+} und einer Inkubationszeit von 60 Minuten getestet. (siehe Abb.5)

Ein Maximum der Stimulation konnte wie aus Abb. 5 ersichtlich mit einer Konzentration von 0.5 - 1 μ g/50 μ l Ansatz erzielt werden, was bedeutet, daß das System bei diesen Konzentrationen bereits mit mRNA gesättigt war. Bei höheren Konzentrationen von mRNA nahm der Einbau ab und lag bei Konzentrationen von 8 μ g mRNA/50 μ l Ansatz nur noch geringfügig über dem endogenen Einbau.

4.2.2 Abhängigkeit der Proteinsynthese von der Inkubationszeit ($\bar{m}$ mRNA)

Im folgenden Versuch sollte das Ausmaß der Translation von der Dauer der Inkubation getestet werden. Bei 65 mM K^+ , 2.1 mM Mg^{2+} und 0.85 μ g/50 μ l Ansatz wurden Inkubationszeiten von 0 - 180 Minuten vorgegeben. (siehe auch Abb. 6). Abb. 6 zeigt, daß bis ca. 90 Minuten [3H] Leucin sowohl in endogene Proteine als auch in Globinketten eingebaut wird. Längere Inkubationszeiten führen nicht zu weiterer Translation endogener und exogener mRNA. Es ist bemerkenswert, daß bereits nach 30 Minuten mehr als 50% des Gesamteinbaus stattgefunden hat. Die relativ kurze Translationsdauer kann einmal mit der Zerstörung der mRNA,

zum anderen mit der Inaktivierung bestimmter Translationsfaktoren zusammenhängen.

4.3 Translation der mRNA in Gegenwart von RWF

mit den folgenden Experimenten sollte abgeklärt werden, ob die Translation von Globin mRNA durch gewebsspezifische Faktoren weiter zu stimulieren ist. Analoge Untersuchungen wurden für den Kaninchen Globin Messenger von M.B. Mathews et al.⁴²⁾ bereits vorgenommen. Zu diesem Zweck wurden die Polysomen aus Hühnererythroblasten mit 0.5 M KCl extrahiert. Bei dieser Behandlung wird ein Teil der Translationsfaktoren abdissoziiert. Der nach einer 100 000 $\times$ g Zentrifugation gewonnene Ueberstand wird als RWF bezeichnet. Zunächst mußte untersucht werden, ob die Translation in Gegenwart von RWF andere Ionen Optima erforderte. Dabei ergab sich für die Mg^{2+} Konzentration keine Abweichung von dem bereits gefundenen Wert von ca. 2.1 mM. Bei einer optimalen RWF Konzentration, die bei 0.06 E_{280/50} μ l Ansatz gefunden wurde, konnte jedoch ein stark abweichender Wert für das K^+ Optimum festgestellt werden. Wie aus Abb. 7 ersichtlich, lag das Maximum für K^+ bei 95 mM. Im nächsten Versuch wurde eine mRNA Konzentrationskurve in Anwesenheit und Abwesenheit ribosomaler Waschfraktionen bei den jeweiligen Ionen Optima in einer gleichen Aszites Präparation gegenübergestellt. Die Konzentration an RWF betrug 0.06 E_{280/50} μ l Ansatz. (Siehe Abb. 8) Dieser Test zeigte, daß sich die Proteinsynthese in Gegenwart exogener mRNA durch Zugabe von RWF um ein vielfaches steigern ließ. Während auf Zugabe von mRNA durchschnittliche Stimulationsraten der Proteinsynthese von 300 - 500% beobachtet werden konnten, erhöhten sich diese Werte in Anwesenheit von RWF auf 1 000 - 2 000%. Der endogene Einbau dagegen blieb in Anwesenheit ribosomaler Waschfraktionen fast gleich, was auf eine nur geringfügige Kontamination von RWF an mRNA schliessen läßt. Auffällig war,

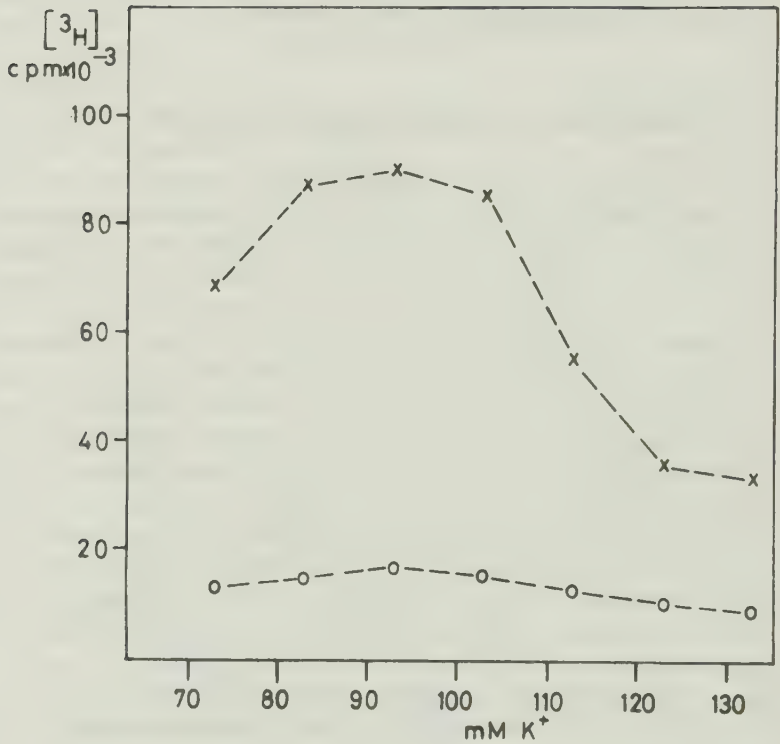


Abb. 7 K^+ Kurve in Gegenwart---+--- und Abwesenheit
--o--o-- von Globin mRNA mit ribosomalen
Waschfraktionen.
 Mg^{2+} : 2.1 mM; RWF: 0.06 $\text{E}_{280}/50 \mu\text{l}$ Ansatz;
mRNA: 0.85 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ Ansatz; Inkubationsdauer:
60 Minuten.

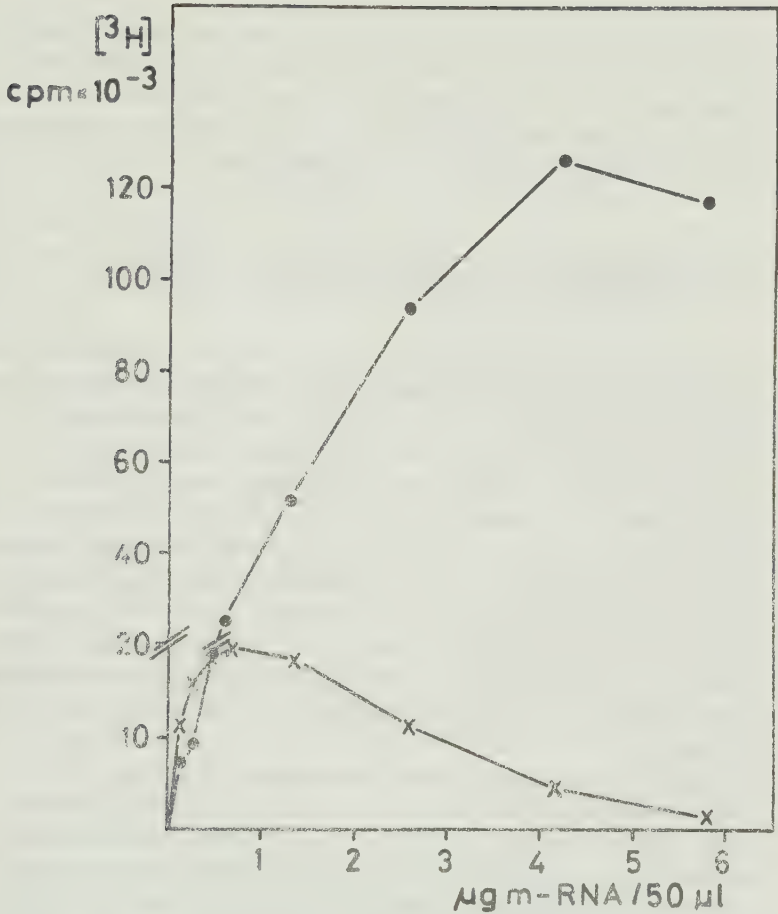


Abb. 3 Globin mRNA Konzentrationskurve in Gegenwart und Abwesenheit ribosomaler Waschfraktionen.
 Mg^{2+} : 2.1 mM; K^{+} : 65 mM (---+---+---)
 K^{+} : 95 mM (---●---●---); RWF: 0.06 $\text{E}_{280}/50 \mu\text{l}$ Ansatz;
Inkubationsdauer: 60 Minuten
Die endogenen Aktivitäten (7 500 Impulse/Minute in Abwesenheit, 8 000 Impulse/Minute in Anwesenheit von RWF) wurden abgezogen.

daß in Gegenwart von RWF das System erst bei höheren mRNA Konzentrationen gesättigt war. Das Maximum lag bei ca. 4 μ g/50 μ l Ansatz gegenüber 0.5 - 1 μ g/50 μ l Ansatz bei Abwesenheit von RWF. Bei höheren Konzentrationen an mRNA kam es zu einer Abnahme der Proteinsynthese.

4.4 Produktanalyse der in Gegenwart von mRNA synthetisierten Proteine

Zum Beweis, daß die bei der Proteinsynthese eingesetzte RNA Fraktion die Globin mRNA enthält, wurde eine Produktanalyse durchgeführt. Da in Gegenwart von ribosomalen Waschfraktionen höhere Stimulationsraten beobachtet werden konnten (s. Kap. 4.3), wurden zunächst Ansätze mit RWF analysiert. Dazu wurde ein 10facher Inkubationsansatz durch Zugabe von EDTA gestoppt, wobei die Polysomen dissoziieren. Nach Zugabe von 15 mg unmarkierter Hühneryoglobin-ketten, die in Anlehnung an R.E.Lockard und J.B.Lingrel³⁷⁾ isoliert wurden, wurde der Ansatz auf einer Sephadex G 100 Säule in 7 M Harnstoff (pH 2.5) chromatographiert. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen mit und ohne mRNA getestet. (s. Abb. 9)

Die kontinuierliche Extinktionsmessung bei 280 nm zeigt zwei Peaks, wobei der erste durch hochmolekulares Material aus Aszites-Extrakt und RWF verursacht wird, während der zweite den zugegebenen unmarkierten Globinketten zuzuordnen ist. Die endogen eingebaute [^3H] Aktivität wird zum überwiegenden Anteil mit dem hochmolekularen Material eluiert. Zugabe von mRNA bewirkt einen Anstieg der Radioaktivität dieses Materials, der größte Teil wird jedoch zusammen mit den unmarkierten Globinketten eluiert. Ob der durch Zugabe von mRNA bewirkte Anstieg der [^3H] Aktivität des hochmolekularen Materials auf Aggregate neusynthetisierter Globinketten, [^3H] Leucin beladene tRNA oder Synthese anderer Proteine zurückzuführen ist, konnte nicht geklärt werden.

Die Fraktionen, die Globinketten enthielten, wurden gepoolt und nach Dialyse einer Carboxymethylcellulose Chromatographie unterworfen. (siehe Abb. 10)

Durch Zugabe von mRNA konnte eine Synthese d.h. Einbau von [^3H] Aktivität in alle drei Spezies festgestellt werden. Die Verteilung der [^3H] Aktivität auf die einzelnen Ketten war aber unterschiedlich. Ob es sich bei dem in Fraktion 29 eluierten radioaktiven Material um eine Vorstufe des Globins oder um ein anderes Protein handelte, wurde nicht untersucht.

Wurde die Proteinsynthese in Abwesenheit ribosomaler Waschfraktionen durchgeführt, konnten übereinstimmende Ergebnisse bezüglich der Verteilung der eingebauten [^3H] Aktivität erzielt werden. Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß durch Zugabe von RWF keine anderen Proteine synthetisiert werden oder die Synthese bestimmter Globinspezies stärker stimuliert wird.

Als Ergebnis der Produktanalyse kann man sagen, daß durch Zugabe der mRNA Fraktion überwiegend Globinketten synthetisiert werden. Das bedeutet, daß die isolierte mRNA hauptsächlich aus Globin mRNA besteht. Ob und inwieweit eine Kontamination mit anderen mRNA Spezies vorliegt, konnte durch Experimente dieser Art nicht geklärt werden.

4.5 Isolierung von mRNP

Zur Isolierung des mRNP Komplexes wurde die dem Maximum der Extinktionskurve entsprechende Fraktion des Zonalgradienten(s. 4.1) verwendet. Eine Konzentrierung dieser Fraktion z.B. durch Abzentrifugieren und Losen in geringen Puffervolumina, Ultrazentrifugation oder Lösungsmittelentzug durch Sephadex G 25 verlief insofern ergebnislos, da das Material ausfiel bzw. seine Aktivität verlor. Somit blieb als Alternative lediglich, das Material in hohen

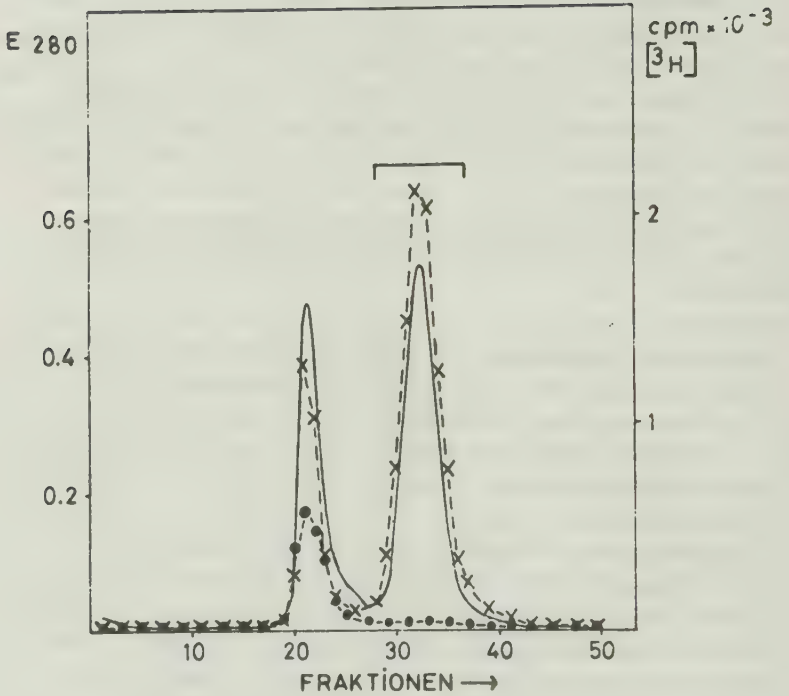


Abb. 9 Sephadex G 100 Chromatographie

Zehnfache Inkubationsansätze (Mg^{2+} : 2.1 mM; K^+ : 95 mM; RWF: 0.6 $E_{280}/500 \mu l$ Ansatz) wurden nach einer Inkubation von 60 Minuten bei $37^\circ C$ mit 0.1 ml 0.3 M EDTA (pH 7.45) gestoppt. Nach Zugabe von 15 mg unmarkierten Hühnerglobinketten ($7.5 E_{280}$) wurden die Proben gegen 7 M Harnstoff dialysiert und auf einer Sephadex G 100 Säule (1.6×100 cm) chromatographiert. Fraktionen zu 2.5 ml wurden gesammelt. Die Radioaktivität der synthetisierten Produkte wurde, wie unter 3.7.2 beschrieben, gemessen.

— E_{280} : Extinktion bei 280 nm

---●--- Impulse/Minute in Abwesenheit von mRNA

---+--- Impulse/minute in Gegenwart von 12 μg mRNA/
500 μl Ansatz

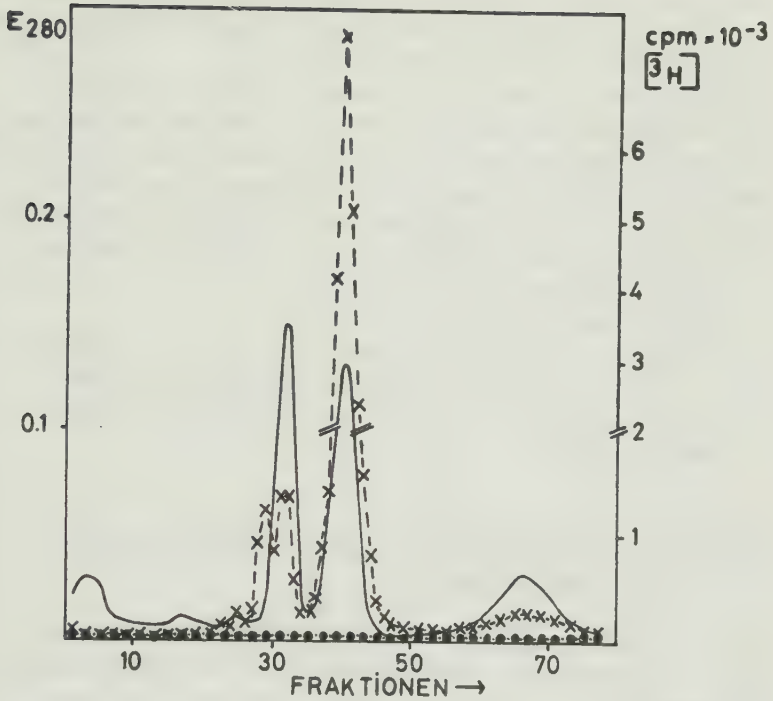


Abb. 10 Carboxymethylcellulose(CM 52,Whatman)Chromatographie

Hühneryglobinketten wurden, wie durch Klammer in Abb. 9 gekennzeichnet, gepoolt, gegen Puffer 17 dialysiert und zur Auftrennung der Ketten an Carboxymethylcellulose (CM 52, Whatman) Säulen (0.6×15 cm) chromatographiert.

Startpuffer: 6 M Harnstoff, 0.127 M Ameisensäure pH 3.54 (eingestellt mit Triäthylamin) Endpuffer: 6 M Harnstoff, 0.508 M Ameisensäure pH 5.14 (eingestellt mit Triäthylamin)

— E₂₈₀ : Extinktion bei 280 nm (Die Basisextinktion des Puffers wurde abgezogen)

Die Messung der Radioaktivität der in Gegenwart ---+---+--- und Abwesenheit ---●---●--- von Globin mRNA synthetisierten Produkte erfolgte wie unter 3.7.2 beschrieben.

konzentrationen auf den Zonalgradienten aufzutragen, was allerdings eine schlechte Trennung von der kleinen ribosomalen Untereinheit zur Folge hatte.

Ausgehend von ca. 300 mg Polysomen erhält man eine RNP Fraktion mit einer Extinktion von 1.05 bei 260 nm. Um die Saccharose und EDTA weitgehend zu entfernen, wurde anschließend eine Dialyse vorgenommen. Als äußerst kritisch in Hinblick auf den nachfolgenden biologischen Test erwies sich hierbei die K^+ und besonders die Mg^{2+} Konzentration des Dialysepuffers, die nach D.Hendrick et al.⁴³⁾ bei ca. 1.7 mM Mg^{2+} und 36 mM K^+ liegen sollte.

Der Nachteil des Dialyseschrittes bestand in einem Verlust von ca. einem Drittel des eingesetzten Materials, der wahrscheinlich durch Adsorption an den Dialyseschlauch bedingt war.

4.6 Analyse der mRNP Fraktion durch isopyknische CsCl Gradientenzentrifugation

Nach Umdialysieren eines Teiles der mRNP Fraktion gegen einen Triäthanolamin enthaltenden Puffer und anschließender Fixierung mit Formaldehyd wurde das Material in einem isopyknischen CsCl Gradienten bis zur Einstellung des Gleichgewichts zentrifugiert. (s. Abb. 11)

Abb. 11 zeigt, daß dem mRNP Komplex eine Schwebelage von $\rho = 1.47 \text{ g/cm}^3$ zukommt, während das ribosomale Material mit seinem Maximum bei $\rho = 1.60 \text{ g/cm}^3$ liegt. Da unter den gegebenen Bedingungen RNA bei $\rho = 1.9 \text{ g/cm}^3$ und Proteine bei $\rho = 1.3 \text{ g/cm}^3$ binden, errechnet sich unter der Voraussetzung, daß die Komplexe nur aus Protein und RNA bestehen, ihr Proteingehalt in Prozent aus der Gleichung:

$$\text{Protein\%} = \frac{1.9}{0.006}$$

zu 50% für ribosomales Material und zu 70 - 75% für den mRNP Komplex.

Eine semiquantitative Auswertung der Extinktionsverteilung führt zu dem Ergebnis, daß die mRNP Fraktion bis zu ca. 50% ribosomales Material enthält. Diese Feststellung ist für

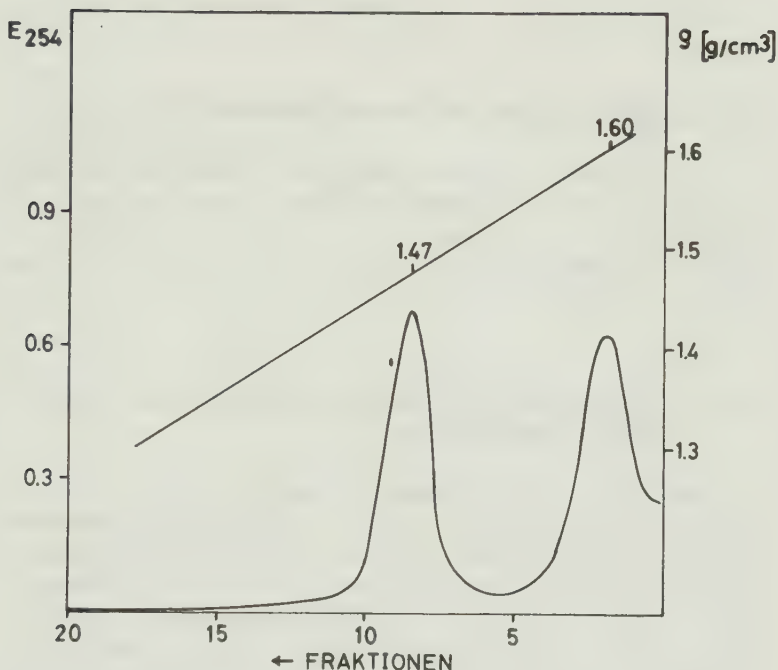


Abb. 11 Isopyknische CsCl Gradientenzentrifugation

2 ml der mRNP Fraktion (entsprechend der Klammer in Abb. 1) wurden gegen Puffer 7 dialysiert. Nach Zugabe von Formaldehyd bis zu einer Endkonzentration von 6% wurde die Lösung 24 Stunden bei 2°C inkubiert, 48 Stunden gegen Puffer 8 dialysiert und mit CsCl auf eine Konzentration von 42% (Gewicht/Gewicht) eingestellt. Zentrifugiert wurde in einem Spinco SW 65 Rotor 48 Stunden bei 50 000 Umdrehungen/Minute und 25°C.

— (E_{254}) Extinktion bei 254 nm.

Konzentrationsangaben bei den Translationsexperimenten von Bedeutung.

4.7 Translation des mRNP im zellfreien System

In den folgenden Versuchen wurde die Translation des Globin mRNP im vorinkubierten zellfreien System aus Ehrlich Aszites Zellen untersucht.

Wie bei der mRNA mußten zunächst die optimalen Bedingungen bestimmt werden.

4.7.1 Abhängigkeit der Translation von K^+ -, Mg^{2+} - und mRNP -Konzentrationen

Zur Bestimmung der optimalen K^+ Konzentration wurde von 40 - 120 mM K^+ variiert. Dabei betrug die Mg^{2+} Konzentration 2.4 mM und die Konzentration der mRNP Fraktion 0.24 μ g/50 μ l Ansatz⁺⁾ . Die Dauer der Inkubation betrug 60 Minuten. Abb. 12 läßt ein relativ scharfes Maximum um 60 mM K^+ erkennen. Bei höheren Konzentrationen war nur noch eine geringfügige Stimulation in Gegenwart von mRNP zu erkennen.

Die Mg^{2+} Konzentrationsreihe wurde von 1.8 mM - 4.3 mM bei 60 mM K^+ und 0.24 μ g der mRNP Fraktion/50 μ l Ansatz durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten. (s. Abb. 13)

Der maximale Einbau von [3H] Leucin konnte unter gegebenen Bedingungen bei einer Mg^{2+} Konzentration von ca. 2.3 mM erzielt werden.

⁺⁾ Bei dieser und folgenden Konzentrationsangaben muß berücksichtigt werden, daß nach den Ergebnissen (Kap. 4.6) die tatsächliche mRNP Konzentration nur ca. 50% beträgt, während der Rest ribosomales Material darstellt.

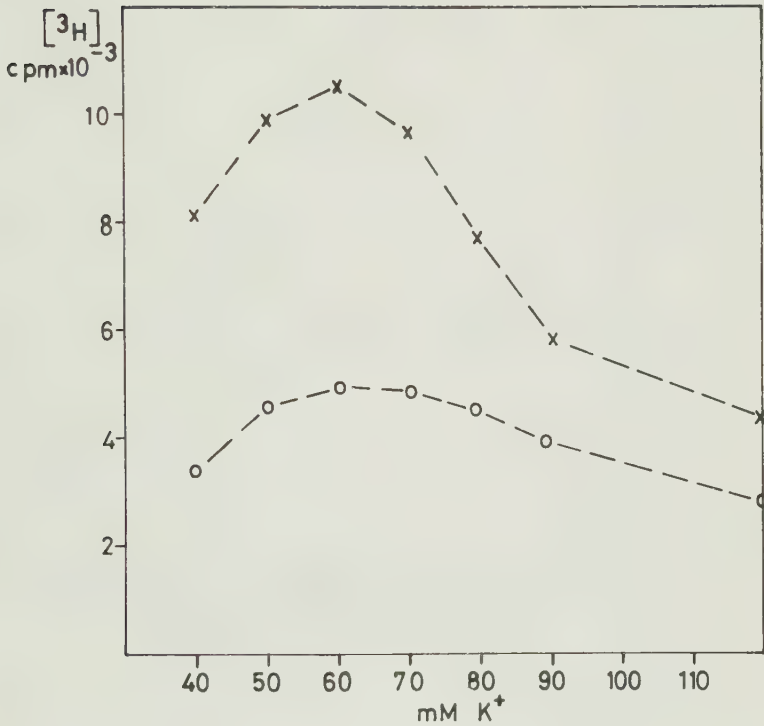


Abb. 12 K⁺Kurve in Gegenwart ---x--- und Abwesenheit
---o--- von Globin mRNP

Mg²⁺ : 2.4 mM; mRNP : 0.24 μ g/50 μ l Ansatz
Inkubationsdauer: 60 Minuten

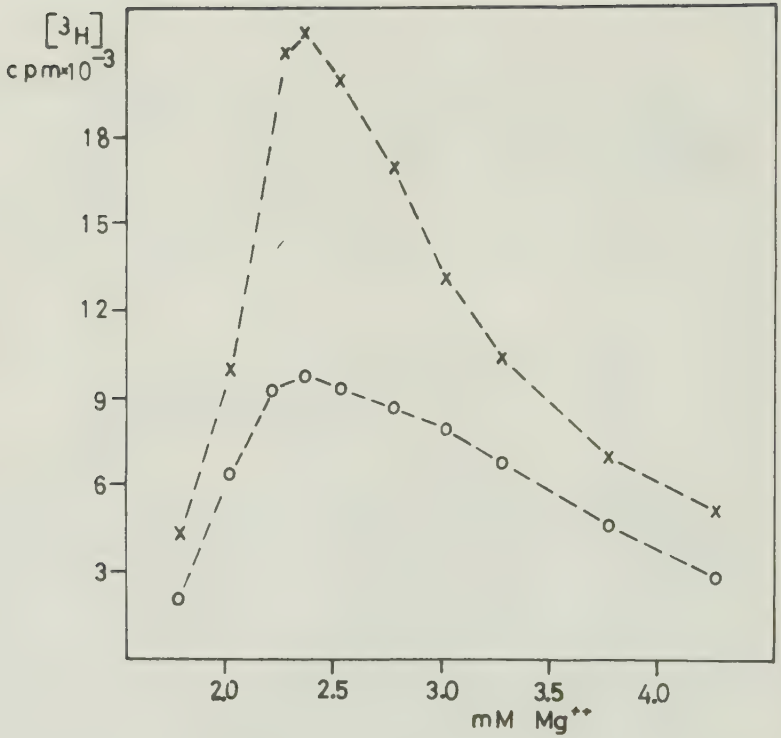


Abb. 13 Mg^{2+} Kurve in Gegenwart ---+---+--- und Abwesenheit ---o---o--- von Globin mRNA.

K^+ : 60 mM mRNA : 0.24 μ g/50 μ l Ansatz
Inkubationsdauer: 60 Minuten.

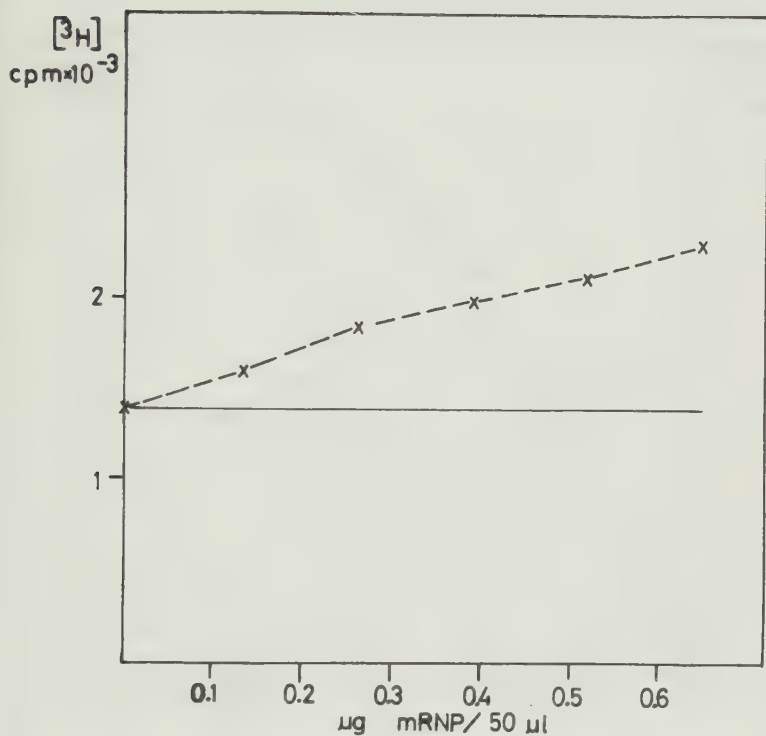


Abb. 14 · Globin mRNA Konzentrationskurve

Mg²⁺ : 2.3 mM ; K⁺ : 60 mM ;

Inkubationsdauer : 60 Minuten

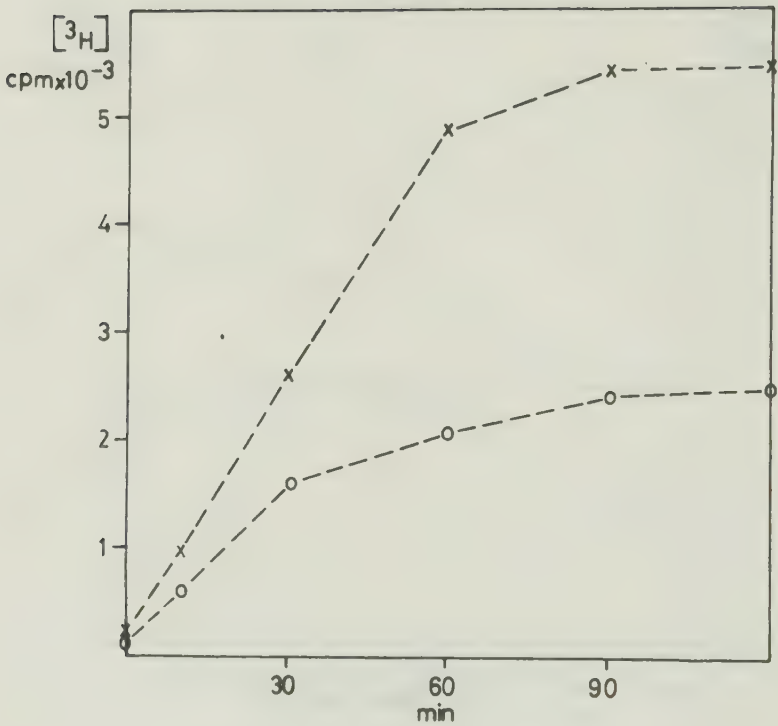


Abb. 15

Abhängigkeit der Proteinsynthese von der Inkubationszeit in Gegenwart ---+---+--- und Abwesenheit --o--o-- von Globin mRNA

Mg²⁺ : 2.3 mM; K⁺ : 60 mM ;

mRNP : 0.24 µg/50 µl Ansatz

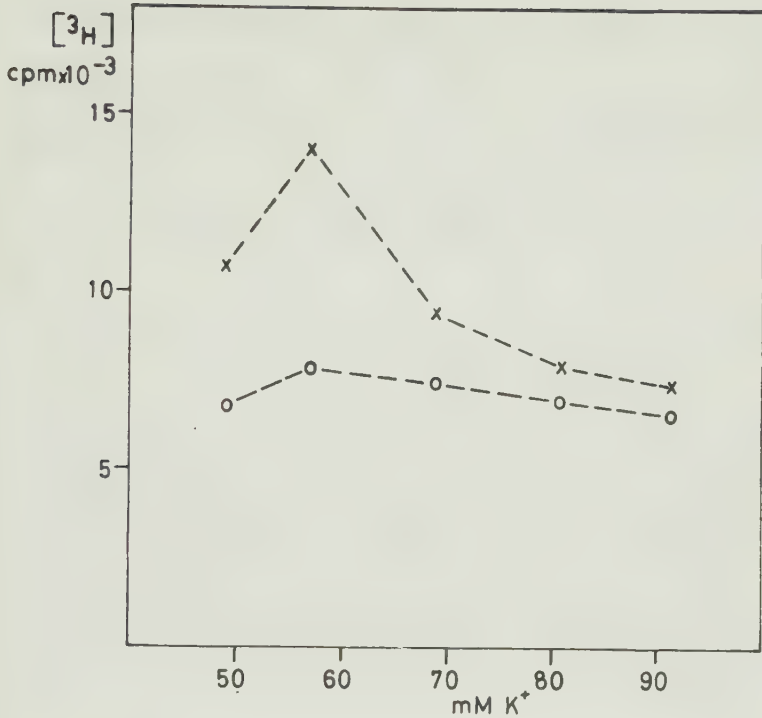


Abb. 16

K⁺ Kurve in Gegenwart ----x---- und Abwesenheit --o--o-- von Globin mRNP unter Zugabe ribosomaler Waschfraktionen.

Mg²⁺: 2.3 mM; RWF: 0.06 E₂₈₀/50 μ l Ansatz
mRNP: 0.2 μ g/50 μ l Ansatz; Inkubationsdauer:
60 Minuten.

Unterschiedliche Konzentrationen von mRNP wurden bei 60 mM K^+ , 2.3 mM Mg^{2+} und einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei 37°C getestet. (s. Anmerkung S.38)

Wie aus Abb. 14 ersichtlich, konnte die mRNP Fraktion in Konzentrationen bis 0.65 $\mu g/50 \mu l$ Ansatz in das zellfreie System eingesetzt werden. Eine Sättigung konnte mit dieser Konzentration nicht erreicht werden.

Aus den in Kap. 4.5 beschriebenen Gründen konnten jedoch keine höheren Konzentrationen getestet werden.

4.7.2 Abhängigkeit der Proteinsynthese von der Inkubationszeit (+ mRNP)

Die Proteinbiosynthese wurde in Gegenwart und Abwesenheit von mRNP nach unterschiedlichen Inkubationszeiten untersucht. Die Konzentration für K^+ betrug 60 mM, für Mg^{2+} 2.3 mM und für die mRNP Fraktion 0.24 $\mu g/50 \mu l$ Ansatz. (s. Abb. 15) Die Abhängigkeit der Proteinsynthese von der Zeit, in Gegenwart von mRNP, war identisch mit der Zeitkurve in Gegenwart von mRNA (Kap. 4.2.2). Nach 60 bis 90 Minuten war kein wesentlicher Einbau von [3H] Leucin zu beobachten.

4.8 Translation des mRNP in Gegenwart von RWF

Im folgenden Test wurde untersucht, ob die Translation von mRNP im zellfreien System aus Aszites Zellen durch Zugabe ribosomaler Waschfraktionen zu beeinflussen war. Zunächst sollten optimale Ionenkonzentrationen für K^+ und Mg^{2+} herausgefunden werden. Bei der Bestimmung des K^+ Optimums betrugen die Konzentrationen der mRNP Fraktion 0.2 $\mu g/50 \mu l$ Ansatz, an Mg^{2+} 2.3 mM und an RWF 0.06 $E_{280}/50 \mu l$ Ansatz. Inkubiert wurde 60 Minuten bei 37°C. Wie Abb. 16 zeigt, ergibt sich ein maximum bei ca. 60 mM K^+ .

Dieser Wert entspricht der bereits für die Translation in Abwesenheit von RWF gefundenen K^+ Konzentration (Kap. 4.7.1). Hierbei ist auffällig, daß bei der Translation von mRNP im Gegensatz zur mRNA in Gegenwart und Abwesenheit ribosomalen Waschfraktionen die K^+ Konzentration den gleichen Optimum Wert hat.

Für das Mg^{2+} Optimum ergab sich ein Wert von 2.3 mM, der von dem bereits für die Translation in Abwesenheit von RWF gefundenen Wert nicht abwich.

Die Translation des mRNP wurde in Gegenwart und Abwesenheit ribosomaler Waschfraktionen unter Einhaltung optimaler Ionenbedingungen bis zu einer Konzentration von 0.6 μ g der mRNP Fraktion/50 μ l Ansatz verglichen. Wie schon in Kap. 4.7.1 beschrieben, konnte bis zu dieser Konzentration keine Sättigung erzielt werden. Weiterhin war festzustellen, daß die durch mRNP bewirkte Stimulation durch Zugabe ribosomaler Waschfraktionen nicht gesteigert werden konnte. Allerdings muß in diesem Zusammenhang berücksichtigt werden, daß auch bei der Translation der mRNA in Konzentrationen bis 0.5 μ g/50 μ l Ansatz die Zugabe von RWF keinen Effekt auf die Stimulationsrate hatte (Kap. 4.3), so daß bei höheren mRNP Konzentrationen durchaus eine Steigerung der Proteinsynthese stattfinden kann.

4.9 Produktanalyse der in Gegenwart von mRNP synthetisierten Proteine

Um die auf Zugabe von mRNP in vitro synthetisierten Produkte zu untersuchen, wurde eine Produktanalyse, wie in Kap. 4.4 beschrieben, durchgeführt. Hierfür wurden jeweils Doppelbestimmungen mit und ohne mRNP getestet.

Da bei einer Konzentration der mRNP Fraktion von 0.6 μ g/50 μ l Ansatz durch ribosomale Waschfraktionen keine Steigerung der Stimulationsrate (Kap. 4.8.5) erzielt werden konnte, wurden keine Faktoren hinzugegeben. Nach der

Inkubation wurde das Material in Gegenwart unmarkierter Globinketten auf einer Sephadex G 100 Säule in 7 M Harnstoff (pH 2.5) chromatographiert.

Die Extinktion des Eluates wurde kontinuierlich bei 280 nm gemessen.

Abb. 17 zeigt zwei Peaks, wobei der erste hochmolekulares Material aus Aszites Extrakt, der zweite hingegen Globinketten enthält. Die endogen eingebaute [^3H] Aktivität wird nahezu ausschließlich mit dem hochmolekularen Material eluiert. Zugabe von Globin mRNP bewirkt zwar einen geringfügigen Anstieg dieses Materials, jedoch findet sich der größte Anstieg der [^3H] Aktivität bei den Globinketten. Die Fraktionen, die Globin enthielten, wurden gepoolt. Nach der Dialyse erfolgte eine Trennung der Ketten durch Carboxymethylcellulose (CM 52) Chromatographie.

Abb. 18 läßt eine unterschiedliche Verteilung der [^3H] Aktivität auf die einzelnen Ketten erkennen, wobei die höchste Syntheserate bei dem Material, das mir den Fraktionen 30 bis 34 eluiert wurde, zu beobachten war.

4.10 Vergleich von mRNA und mRNP

4.10.1 Vergleich der Absorptionsspektren

Ein Vergleich der Absorptionsspektren von Globin mRNA und Globin mRNP zeigt ein für die mRNA typisches Spektrum mit einem $E_{260/280}$ Quotienten von 2.00. Für die mRNP Fraktion beträgt der Quotient 1.75 und ist somit wesentlich geringer, was für das Vorhandensein beträchtlicher Mengen an Protein spricht.

4.10.2 Vergleich der Ionenbedingungen

Ein Vergleich der Ionenoptima von mRNP und mRNA bezüglich der Translation im zellfreien System aus Aszites Zellen

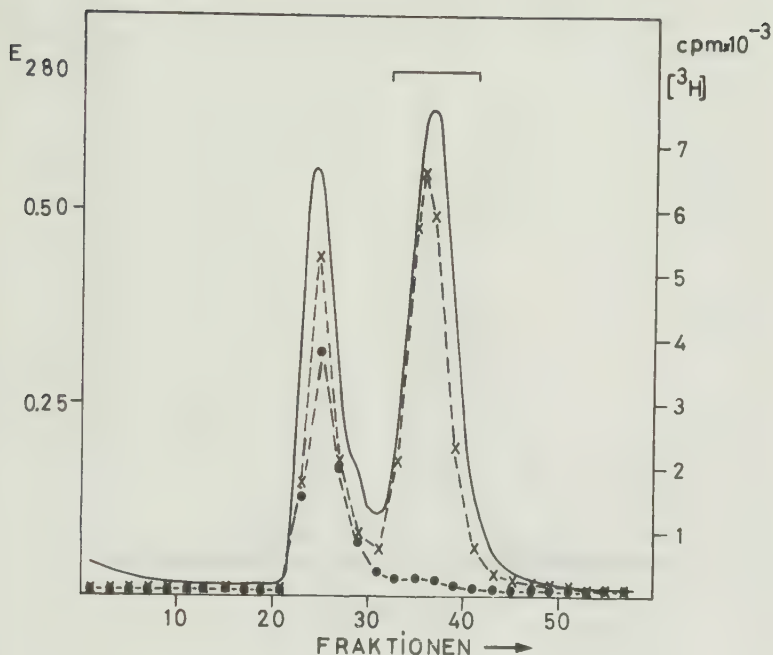


Abb. 17 Sephadex G 100 Chromatographie

Zehnfache Inkubationsansätze (Mg^{2+} : 2.3 mM; K^+ : 60 mM) wurden nach einer Inkubation von 60 Minuten bei 37°C mit 0.1 ml 0.3 M EDTA (pH 7.45) gestoppt. Nach Zugabe von 15 mg unmarkierten Hühneryoglobinketten (7.5 E₂₈₀) wurden die Proben gegen 7 M Harnstoff dialysiert und auf einer Sephadex G 100 Säule (1.6 × 100 cm) chromatographiert. Fraktionen zu 2.5 ml wurden gesammelt. Die Radioaktivität der synthetisierten Produkte wurde, wie unter 3.7.2 beschrieben, gemessen.

— E₂₈₀ Extinktion bei 280 nm
 -●-●- Impulse/Minute in Abwesenheit von mRNP
 -+--+ Impulse/Minute in Gegenwart von 4.8 µg der mRNP Fraktion/500 µl Ansatz

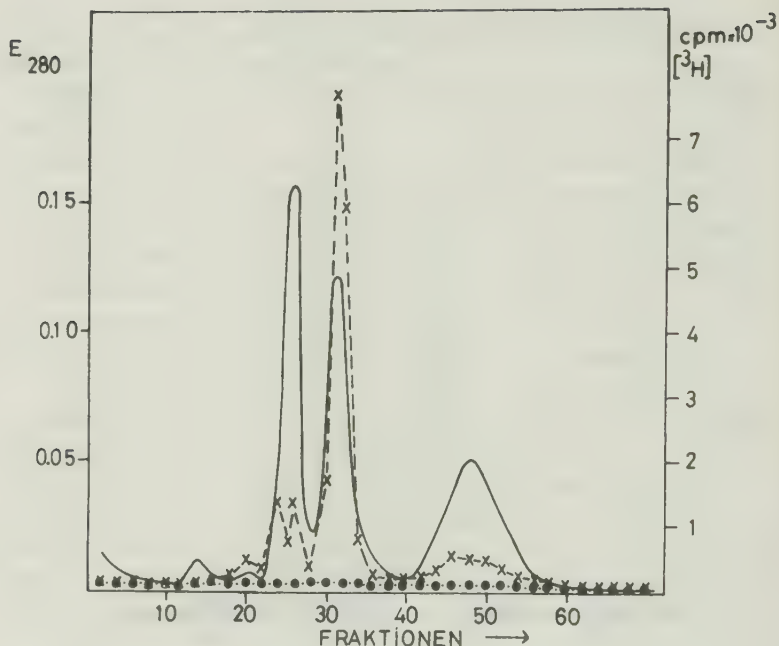


Abb. 18 Carboxymethylcellulose-Chromatographie

Hühneryoglobinketten wurden, wie durch die Klammer in Abb. 17 gekennzeichnet, gepoolt, gegen Puffer 17 dialysiert und zur Auftrennung der Ketten an Carboxymethylcellulose (CM 52, Whatman) Säulen (0.6 × 15 cm) chromatographiert. Startpuffer: 6 M Harnstoff, 0.127 M Ameisensäure, pH 3.54 (eingestellt mit Triäthylamin) Endpuffer: 6 M Harnstoff, 0.508 M Ameisensäure, pH 5.14 (eingestellt mit Triäthylamin)

— E₂₈₀ Extinktion bei 280 nm

Die Basisextinktion des Puffers wurde abgezogen. Die Messung der Radioaktivität der in Gegenwart --+--+-- und Abwesenheit --●--●-- von Globin mRNA synthetisierten Produkte erfolgte wie unter 3.7.2 beschrieben.

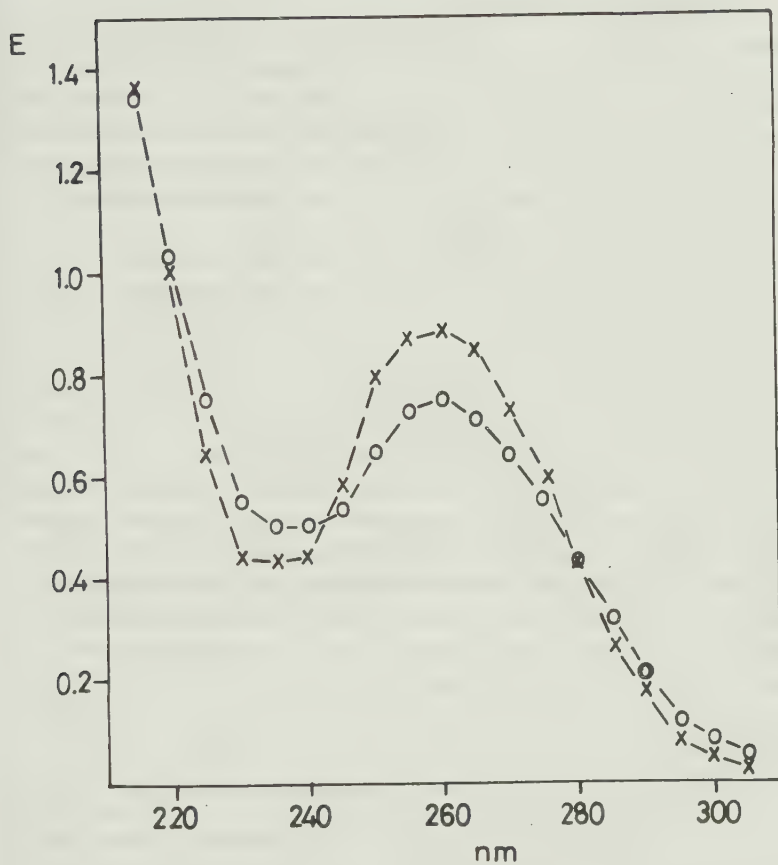


Abb. 19 Extinktionsspektren

---+---+---

Globin mRNA

---o---o---

Globin mRNP fraktion

ergab keine wesentlichen Unterschiede. Für Globin mRNA lagen die Werte bei ca. 65 mM K^+ und 2.1 mM Mg^{2+} , für Globin mRNP bei ca. 60 mM K^+ und 2.3 mM Mg^{2+} .

Nur in Gegenwart ribosomaler Waschfraktionen konnten unterschiedliche Ionenbedingungen, was die K^+ Konzentration betraf, festgestellt werden. So hatte die mRNA ein wesentlich höheres K^+ Optimum bei ca. 95 mM, während hingegen das Optimum für mRNP von dem bereits bei ca. 60 mM K^+ in Abwesenheit von RWF gefundenen Wert nicht abwich. Die Mg^{2+} Werte waren in Gegenwart und Abwesenheit von RWF identisch.

4.10.3 Vergleich der biologischen Aktivität

Um eine Aussage über die biologische Aktivität von Globin mRNA im Vergleich zum Globin mRNP machen zu können, wurden parallele Proteinbiosyntheseansätze bei jeweils optimalen Ionenbedingungen mit der gleichen Aszites Fraktion durchgeführt. Letzteres war von besonderer Bedeutung, da die Aktivität des zellfreien Systems aus Aszites Zellen von Aufarbeitung zu Aufarbeitung variierte.

Tabelle 1

	$[^3H]$ Leucin eingebaut cpm/50 μ l Ansatz	Stimulationsrate (%)
endogen	3223	-----
mRNA	6536	103
mRNP	5309	63

Jeder 50 μ l Ansatz enthielt 0.4 E_{260} Einheiten eines 30 Minuten vorinkubierten Aszites Extraktes, 0.5 μ g der mRNA bzw. der mRNP Fraktion pro Ansatz, 20 mM TRIS,

65 mM bzw. 60 mM K^+ , 2.1 mM bzw. 2.3 mM Mg^{2+} . Inkubiert wurde 60 Minuten bei $37^{\circ}C$.

Wie Tabelle 1 zeigt, beträgt der Einbau von [3H] Leucin in Proteine in Gegenwart von mRNA 6536 cpm/Ansatz (entsprechend 103% Stimulation) gegenüber 5309 cpm/Ansatz in Anwesenheit von mRNP (entsprechend 63% Stimulation).

Hierbei ist jedoch zu beachten, daß die eingesetzte mRNP Fraktion, wie bereits in Kap. 4.6 beschrieben, 50% ribosomales Material enthält. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache ergibt sich daraus eine Stimulationsrate von ca. 125%, was bedeutet, daß die biologische Aktivität von Globin mRNP geringfügig größer ist, als die der mRNA. Allerdings wäre auch eine Steigerung des endogenen Einbaus aufgrund der ribosomalen Kontamination nicht auszuschließen; eine Ueberschlagsrechnung ergibt aber, daß diese Menge an kleiner Untereinheit weit unter der durch den Aszites vorgegebenen Menge liegt (ca. 2%). Eine merkliche Stimulation ist hierbei nicht zu erwarten, zumal das zellfreie System mit der angegebenen mRNP Konzentration nicht gesättigt ist.

4.10.4 Vergleich der Produktanalysen

Anhand der Produktanalyse konnte festgestellt werden, daß sowohl durch Zugabe der Globin mRNA als auch der mRNP Fraktion, Globinketten synthetisiert werden.

Hinsichtlich der Verteilung der [3H] Aktivität konnten keine Unterschiede beobachtet werden. Das bedeutet, daß in Gegenwart von mRNA und mRNP gleiche Proteine synthetisiert werden und die Synthese bestimmter Globin-Spezies im gleichen Verhältnis stattfindet.

5. Diskussion

Durch EDTA Dissoziation von Polysomen aus unreifen roten Blutzellen anämischer Hühner wurde der zwischen 15 S und 20 S sedimentierende Globin-Messenger-Ribonucleoprotein-Komplex gewonnen. Wie durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation gezeigt werden konnte, stellte sich dieser Komplex bei einer Schwebedichte von 1.47 g/cm^3 ein. Dieser Wert entspricht einer Zusammensetzung von ca. 70% Protein und 30% RNA. Abspaltung der Proteine durch Phenolextraktion ermöglicht die Isolierung der bei 9 S sedimentierenden Globin messenger RNA. Durch die Translation beider Fraktionen in einem heterologen zellfreien System unter jeweils optimalen Bedingungen sollte untersucht werden, in wieweit die Proteine des mRNP Komplexes die Effizienz der Translation der mRNA beeinflussen.

Als zellfreies System diente eine Fraktion, die aus Aszites Tumorzell-Homogenaten durch Abtrennen der Zellkerne und Mitochondrien gewonnen wurde. Dieses heterologe System bietet gegenüber den Reticulocyten-Lysaten den Vorteil, daß endogen keine Globinketten synthetisiert werden, was die Produktanalyse der durch Zugabe von Globin mRNA bzw. mRNP synthetisierten Produkte erleichtert.

Ferner kann durch eine Vorinkubation von 30 Minuten bei 37°C ein großer Teil der endogenen mRNA zerstört werden, so daß durch anschließende Zugabe exogener mRNA bzw. mRNP eine beträchtliche Stimulation erzielt werden kann.

Zunächst wurden optimale Ionenbedingungen für die Translation der mRNA bzw. des mRNP festgelegt. Die Stimulation der Proteinsynthese durch Zugabe von Globin mRNA bzw. mRNP ist von der K^+ und Mg^{2+} Konzentration abhängig. Ein Vergleich beider Ionenoptima ergab für Globin mRNA Werte von 65 mM K^+ und 2.1 mM Mg^{2+} , für Globin mRNP ca. 60 mM K^+ und 2.3 mM Mg^{2+} , also keine wesentlichen Unterschiede.

Sowohl durch Zugabe von mRNA als auch von mRNP zum zellfreien

System erfolgte eine Proteinsynthese über einen Zeitraum von 90 Minuten, wobei bereits mehr als 50% des Gesamteinbaus nach 30 Minuten erreicht war. Die Sättigung mit mRNA lag bei einer Konzentration von 0.5 bis 1 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ Ansatz. Bei höheren Konzentrationen nahm die Proteinsyntheserate wieder ab. Neben anderen Möglichkeiten kann dies auf eine Bindung von mindestens zwei begrenzenden Faktoren an verschiedene RNA Moleküle zurückgeführt werden. Für den Fall des mRNP konnte eine Sättigung nicht erzielt werden, da es auch durch Anwendung verschiedener Methoden nicht gelang, die mRNP Fraktion hinreichend zu konzentrieren. Bei maximalen Konzentrationen von 0.65 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ Ansatz war das System noch nicht gesättigt.

Durch Zugabe einer Fraktion ribosomaler Waschfraktionen aus Polysomen von Hühnererythroblasten konnte die durchschnittliche Stimulationsrate der Proteinsynthese in Gegenwart exogener Globin mRNA von ca. 300 bis 500% auf 1 000 bis 2 000% gesteigert werden. Dabei war auffällig, daß bei einem K^+ Optimum von 95 mM das System erst mit höheren Konzentrationen an mRNA gesättigt werden konnte. Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß das zellfreie System bei höheren mRNA Konzentrationen einen Mangel an Translationsfaktoren aufweist. Dafür spricht auch die schnelle Sättigung des Systems in Abwesenheit von RWF und die Tatsache, daß Zugabe von RWF die optimale mRNA Konzentration zu höheren Werten verschiebt. Hinsichtlich der Produktanalyse in Gegenwart und Abwesenheit von RWF konnten keine qualitativen Unterschiede festgestellt werden. Es wurden weder andere Proteine synthetisiert noch die Synthese einer bestimmten Globin-Spezies stärker stimuliert.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage der Spezifität der Translationsfaktoren. Einerseits postulierten A.W.Rourke und S.M.Heywood⁴⁴⁾ für Myosin mRNA gewebespezifische Faktoren, andererseits erwiesen sich ribosomale Waschfraktionen aus Reticulocyten als sehr unspezifisch. So konnte z.B. die Translation von Linsenkrystallin

mRNA (W.B.Mathews et al.⁴²) Encephalomyocarditis Virus mRNA und Phagen ϕ B mRNA (S.Metafora et al.⁴⁵) durch Zugabe von Reticulocyten-Translationsfaktoren stimuliert werden, hingegen konnte bei mengovirus RNA (B.Lebbleu et al.⁴⁶) kein Effekt festgestellt werden.

Eine Lösung dieses Problems scheint darin zu liegen, daß spezifische Faktoren existieren, die zwar nicht für eine einzelne mRNA jedoch für bestimmte Gruppen von messenger RNAs spezifisch sind. Solche Faktoren wurden auch von U.Nudel et al.⁴⁷) und K.Marcker et al.⁴⁸) gefunden. Bei der in vitro Translation von Globin mRNA aus Huhn und Kaninchen konnte ferner eine geringfügige, jedoch deutliche Speziespezifität der Faktoren beobachtet werden. (W.Knöchel et al.⁴⁹)

Ein Effekt der ribosomalen Waschfraktionen auf die Translation von mRNP konnte nicht nachgewiesen werden. Diese Beobachtung muß jedoch insofern eingeschränkt werden, da in dem untersuchten Konzentrationsbereich auch bei der Translation der mRNA keine Stimulation zu sehen war, was aber einen Effekt bei höheren Konzentrationen nicht ausschließt.

Die Produktanalyse der durch Zugabe von mRNP neusynthetisierten Proteine im Vergleich zur mRNA keine qualitativen Unterschiede, d.h. es wurden die gleichen Proteine im gleichen Verhältnis synthetisiert.

Die Funktion der Proteine des mRNP Komplexes ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht geklärt. Außer der zu Beginn dieser Arbeit erwähnten Funktion beim Transport der mRNA vom Kern in das Cytoplasma und der Beteiligung an der Translationskontrolle, kommt eine Schutzfunktion beim Abbau der mRNA vor RNAase in Betracht. Gegen die letzte Möglichkeit sprechen jedoch einmal die Befunde, daß sowohl mRNA als auch mRNP sehr empfindlich gegenüber RNAase sind (W.Knöchel⁵⁰), zum anderen die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung hinsichtlich der Proteinsynthese in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei Gegenwart von mRNA bzw. mRNP. Für den Fall einer Schutzfunktion

des Proteins sollte für den RNP-Komplex eine längere Translationsdauer zu erwarten sein, was jedoch nicht der Fall war.

Im Hinblick auf die Beteiligung der Proteine bei der Translationskontrolle folgt als wesentliches Ergebnis dieser Arbeit, daß mRNA und mRNP mit annähernd gleicher Effizienz im zellfreien System translatiert werden. Ein direkter Vergleich bei optimalen Ionenbedingungen ergab eine Stimulation der Proteinsynthese von ca. 125% nach Zugabe von mRNP gegenüber 103% nach Zugabe von mRNA. Die Versuche wurden unter Bedingungen durchgeführt, bei denen das System nicht mit mRNA gesättigt war. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von D.Hendrick et al.⁴³⁾ überein, der die Stimulation von Globin mRNA und mRNP aus Kaninchen Reticulocyten miteinander in einem zellfreien System aus Hühnerembryonen-Gehirn und in einem System aus Ehrlich Aszites Zellen verglich. Dabei konnte der mRNP Komplex mit ca. 30% höherer Effizienz übersetzt werden. Der geringe Unterschied läßt eine direkte Beteiligung der Proteine im mRNP Komplex an der Kontrolle der Translation wenig wahrscheinlich erscheinen. Dem stehen jedoch andere Befunde gegenüber. Während ungewaschene 40 S ribosomale Untereinheiten aus Kaninchen Reticulocyten-Lysat sowohl den Kaninchen mRNP Komplex als auch die freie mRNA binden, können mit Natriumdesoxycholat gewaschene 40 S Untereinheiten nur mit dem mRNP Komplex reagieren (B.Lebieu et al.⁵¹⁾). Diese Beobachtung deutet auf eine Beteiligung des mRNP Komplexes an der Initiation hin. Gestützt wird diese Theorie durch weitere Experimente mit ribosomalen Untereinheiten aus Kaninchen Reticulocyten, in denen eine Bildung des Initiationskomplexes aus ribosomaler Untereinheit und Initiationsfaktoren nur in Gegenwart von Kaninchen-Globin-mRNP jedoch nicht von mRNA beschrieben wird (L.M.Cashion und W.M.Stanley⁵²⁾). J.Ilan und J.Ilan⁵³⁾ nehmen an, daß bei Tenebrio ein Protein des RNP-Komplexes ein Initiationsfaktor der Translation ist. Dieser Widerspruch könnte folgendermaßen interpretiert werden.

Geht man davon aus, daß die Proteine des mRNP Komplexes in verschiedenen Geweben sehr ähnlich sind, - dafür sprechen die in der Einleitung erwähnten Elektrophoreseuntersuchungen (R.N.Bryan und M.Hayashi²²) -, ist anzunehmen, daß auch die postmitochondriale Ueberstandsfraktion aus Aszites Zellen diese Proteine enthält. Bei Zugabe exogener mRNA können sich diese Faktoren an den freien messenger binden, was somit zu den gleichen Versuchsergebnissen führt, wie die Zugabe von exogenem mRNP Komplex. Nur ein System, das aus gereinigten Einzelbestandteilen aufgebaut wäre (wie z.B. aus gewaschenen Ribosomen, Initiations-, Elongations-, Terminations-Faktoren, tRNA, tRNA-Synthetase u.a.) würde Aufschlüsse über die Beteiligung der Proteine des mRNP Komplexes in Bezug auf die Translationskontrolle vermitteln. Für die in dieser Arbeit ausgeführten Versuche kann eine solche Beteiligung an der Translationskontrolle nicht nachgewiesen werden, darf aber auch nicht ausgeschlossen werden.

6. Zusammenfassung

Globin-messenger-Ribonucleoproteid und messenger Ribonucleinsäure wurden aus Hühnererythroblastenpolysomen isoliert. Während die Fraktion des mRNP Komplexes, dessen CsCl-Schwebedichte von 1.47 g/cm^3 auf eine Zusammensetzung von 70% Protein und 30% RNA deutet, zu ca. 50% mit kleiner ribosomaler Untereinheit kontaminiert war, konnte durch erneute Saccharosegradientenzentrifugation und anschließende Phenolextraktion Globin messenger RNA als einheitlich bei 9 S sedimentierende Fraktion gewonnen werden. Beide Fraktionen wurden in einem bei 37°C 30 Minuten vorinkubierten zellfreien System aus Ehrlich Aszites Tumorzellen translatiert. Optimale Bedingungen wurden hinsichtlich der K^+ , Mg^{2+} , mRNA bzw. mRNP Konzentration und der Dauer der Inkubation festgelegt.

Die Synthese von Globin ließ sich am Einbau von [^3H] markiertem Leucin verfolgen. Die Analyse der neusynthetisierten Globinketten erfolgte nach Zugabe von unmarkiertem Träger Globin durch Gelfiltration an Sephadex G 100, Chromatographie an Carboxymethylcellulose (CM 52, Whatman) und Messung ihrer Radioaktivität.

Die Proteinsynthese vorinkubierter Fraktionen aus Aszites Tumorzellen, die einen geringen endogen Einbau aufweisen, konnte durch Zugabe von Hühner Globin mRNA um ca. 300 bis 500% gesteigert werden. Die Stimulationsrate ließ sich in Gegenwart ribosomaler Waschfraktionen aus Hühnererythroblasten auf 1000 bis 2 000% steigern, was einen Mangel des zellfreien Systems an Translationsfaktoren nahelegt. Ein Vergleich der Translation von mRNA und mRNP ergab nur geringfügige Unterschiede hinsichtlich der Stimulationsrate, - mRNP zeigte gegenüber mRNA eine um 25% höhere Stimulation -, und keine Unterschiede hinsichtlich der qualitativen Verteilung der neusynthetisierten Proteine. Eine Beteiligung der Proteine des mRNP Komplexes an der Translationskontrolle ist somit fraglich. Da jedoch die Möglichkeit besteht, daß ein ungereinigtes dedifferenziertes System, wie das aus Aszites Tumorzellen, Proteine dieser Art enthält, kann bei Zugabe exogener mRNA eine Bindung dieser Proteine an die mRNA erfolgen. Somit kann eine Beteiligung des Proteins des mRNP Komplexes an der Translationskontrolle nicht ausgeschlossen werden.

7. Literaturverzeichnis

1. F.Jacob und J.Monod, J.Mol.Biol., 3, 318 (1961)
2. S.P.Blatti, C.J.Ingles, T.J.Lindell, P.W.Morris, R.F.Weaver, F.Weinberg und W.J.Rutter, Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol., 35, 649 (1970)
3. P.Chambon, F.Gissinger, J.L.Jr.Mandel, C.Kedinger, M.Gniazdowski und M.Meihlac, Cold Spring Harbor Symp., Quant. Biol., 30, 693 (1970)
4. E.A.Zylber, S.Penman, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 68, 2861 (1971)
5. K.Scherrer, H.Latham, J.F.Darnell, Proc.Natl.Acad. Sci. U.S., 49, 240 (1963)
6. K.Scherrer, L.Marcaud, F.Zajdela, B.Breckenridge und F.Gros, Bull.Soc.Chim.Biol., 48, 1037 (1966)
7. K.Scherrer und L.Marcaud, J.Cell.Physiol., 72 Suppl. 1, 181 (1968)
8. G.P.Georgiev, O.P.Samarina, M.J.Lerman, M.N.Smirnov und A.N.Severtzov, Nature (London), 200, 1291 (1963)
9. G.P.Georgiev, J.Theoret.Biol., 25, 473 (1969)
10. R.Soeiro, J.E.Darnell, J.Cell.Biol., 44, 467 (1970)
11. G.R.Molloy, W.R.Jelinek, M.Salditt und J.E.Darnell, Cel. 1, 43 (1974)
12. J.Mendecki, S.Y.Lee und G.Brawerman, Biochemistry, 11, 792 (1972)
13. G.R.Molloy, M.B.Sporn, D.E.Kelley und R.P.Perry, Biochemistry, 11, 3256 (1972)
14. T.Imaizumi, H.Diggelmann und K.Scherrer, Proc.Natl. Acad.Sci.U.S., 70, 1122 (1973)
15. R.Williamson, C.E.Drewienkiewicz und J.Paul, Nat.New. Biol., 241, 66 (1973)
16. A.Ruiz-Carillo, M.Beato, G.Schatz, P.Feigelson und V.G.Allfrey, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 70, 3641 (1973)
17. R.H.Stevens und A.R.Williamson, Nature, 239, 143 (1972)
18. G.P.Georgiev und O.P.Samarina, Adv.Cell.Biol., 2, 45 (1971)
19. J.Niessing und C.E.Sekeris, Biochim.Biophys.Acta, 209, 484 (1970)

20. J.Niessing und C.E.Sekeris, Nat.New.Biol., 243, 9 (1973)
21. A.S.Spirin, N.V.Beltsina und M.A.Ajtkhozhin,
Zh.Obshch.Biol., 25(5), 321 (1964)
22. R.N.Bryan und M.Hayashi, Nat. New.Biol., 244, 271 (1973)
23. C.Morel, B.Kayibanda und K.Scherrer, FEBS letters,
18, 84 (1971)
24. E.M.Lukanidin, S.Olsnes und A.Pihl, Nat.New.Biol.,
240, 90 (1972)
25. S.Penman, M.Rosbash und M.Penman, Proc.Natl.Acad.Sci.
U.S., 67, 1878 (1970)
26. K.Beyreuther, K.Adler, N.Geisler und A.Klemm,
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 70, 3576 (1973)
27. J.Paul und R.S.Gilmour, J.Mol.Biol., 34, 305 (1968)
28. H.Schall und F.Turba, Biochem.Z., 339, 219 (1963)
29. M.G.Hamilton, in Methods in Enzymology, XX, 512 (1971)
30. A.S.Spirin, N.V.Belitsina und M.I.Lerman, J.Mol.
Biol., 14, 611 (1965)
31. C.L.Schildkraut, J.Marmur und P.Doty, J-Mol.Biol.
4, 438 (1962)
32. H.A.Sober und R.A.Harte, Handbook of Biochemistry,
The Chemical Rubber Co., Cleveland, p.J - 252, (1968)
33. G.Huez, A.Burny, G.Marbaix und B.Lebieu, Biochem.
Biophys.Acta, 145, 629 (1967)
34. H.Aviv und P.Leder, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 69, 1408
(1972)
35. S.M.Heywood, Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.,
34, 799 (1969)
36. M.B.Mathews und A.Korner, Eur.J.Biochem., 17, 328 (1970)
37. R.E.Lockard und J.B.Lingrel, Nat.New.Biol., 233, 204
(1971)
38. M.B.Mathews, Essays in Biochemistry, Vol.9, 86 (1973)
39. Jacobs-Lorena, C.Baglioni und T.W.Borun, Proc.Natl.
Acad.Sci.U.S., 69, 2095 (1972)
40. H.Bloemendal, "Mammalian messenger RNA" in "The Mechanism
of Protein Synthesis and its Regulation", Frontiers of
Biology, 27 (1972), North Holland Publishing Co,
Amsterdam-London

41. M.B.Mathews, M-Osborn und J.B.Lingrel, *Nat.New.Biol.*, 233, 206 (1971)
42. M.B.Mathews, I.B.Pragnell, M.Osborn und H.R.V.Arnstein, *Biochim.Biophys.Acta*, 287, 113 (1972)
43. D.Hendrick, W.Schwarz, S.Pitzel und H.Tiedeman, *Biochim.Biophys.Acta*, 340, 278 (1974)
44. A.W.Rourke und S.M.Heywood, *Biochemistry*, 11, 2061 (1972)
45. S.Metafora, M.Terada, L.W.Dow, P.A.Marks und A.Bank, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.*, 69, 1299 (1972)
46. B.Lebbleu, U.Nudel, E.Falcoff, C.Prives und M.Revel, *FEBS letters*, 25, 97 (1972)
47. U.Nudel, B.Lebbleu und M.Revel, *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.*, 70, 2139 (1973)
48. K.Marcker, A.E.Smith, W.A.Strycharz, M.Ranki und D.Wigle, *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.*, 354, 597 (1973)
49. W.Knöchel, D.Hendrick, S.Schröter und H.Tiedemann, *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.*, 354, 1389 (1973)
50. W.Knöchel, Dissertation Freie Universität Berlin, (1972)
51. B.Lebbleu, G.Marbaix, G.Huez, J.Temmerman, A.Burny und H.Chantrenne, *Eur.J.Biochem.*, 19, 264 (1971)
52. L.M.Cashion, W.M.Stanley, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.*, 71, 436 (1974)
53. J.Ilan und J.Ilan, *Nat.New.Biol.*, 241, 176 (1973)

Lebenslauf

Am 27.9.1949 wurde ich, Sylvia Schröter, als Tochter des Journalisten Heinz Schröter und seiner Ehefrau Gisela, geb. Häslar, in Görlitz geboren.

1950 verlegten meine Eltern ihren Wohnsitz nach Berlin, wo ich von 1956 bis 1958 die 9. Mittelschule in Berlin-Johannisthal und von 1958 bis 1962 die Uckermark-Grundschule in Berlin-Schöneberg besuchte. Von 1962 bis 1969 besuchte ich das Paul-Natorp Gymnasium. Dort legte ich am 5. Februar 1969 die Reifeprüfung ab.

Zum Sommersemester 1969 begann ich an der Freien Universität Berlin mit dem Studium der Humanmedizin. 1970 bestand ich die naturwissenschaftliche, 1971 die ärztliche Vorprüfung.

Mein klinisches Studium absolvierte ich ebenfalls an der Freien Universität Berlin und bestand am 21. Februar 1975 die ärztliche Prüfung.

Seit Oktober 1971 bin ich Doktorandin bei Prof. Dr. Dr. H. Tiedemann am Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin.

